

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Caspase-Aktivität und programmierter Zelltod in Neuroblastomzellen: Regulation durch das Tumorsuppressorprotein p53**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften***

**der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2012**

vorgelegt von: Anja Keim

geb. am: 3.05.1983 in Kaiserslautern

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Anja Keim

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
2.1 Neuroblastome und ihre Behandlungen .....	7
2.2 Arsen .....	8
2.3 Arsenhaltige Verbindungen in der Geschichte der Medizin .....	9
2.4 Arsenit und der Arsenit-induzierte Zelltod .....	10
2.5 Die Rolle von p53 im programmierten Zelltod .....	10
2.6 Die Rolle von JNK und c-Jun im programmierten Zelltod .....	12
2.7 Ziel der Arbeit .....	13
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
3.1 Geräte.....	14
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
3.3 Chemikalien .....	16
3.4 verwendete Stimuli.....	18
3.5 verwendete Inhibitoren.....	18
3.6 Standardlösungen.....	19

3.7 Antikörper .....	21
3.8 Zelllinien .....	22
3.9 Zellkultur .....	22
3.9.1 Passagieren eukaryotischer Zellen.....	23
3.9.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen .....	23
3.9.3 Auftauen eukaryotischer Zellen .....	24
3.9.4 Aussäen eukaryotischer Zellen.....	24
3.9.5 Stimulation eukaryotischer Zellen .....	25
3.9.6 Ernte eukaryotischer Zellen .....	25
3.10 Proteinbiochemische Methoden .....	26
3.10.1 Ganzzellextrakt.....	26
3.10.2 Kernextrakt.....	27
3.10.3 Zytoplasmaextrakt .....	28
3.10.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay .....	29
3.10.5 Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese.....	29
3.10.6 Western Blot von SDS-Gelen .....	31
3.10.7 Proteinfärbung mit Ponceau-S.....	31
3.10.8 Immunzytochemischer Nachweis der Proteine .....	31
3.11 Analyse der Caspase-3/7 Aktivität.....	33
3.11.1 Caspase-Assay .....	33
3.11.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	34

3.12 Manipulation eukaryotischer Zellen.....	35
3.12.1 Gentransfer mittels Lentiviren.....	35
3.12.2 verwendete Plasmide .....	37
3.12.3 Kalziumphosphat-Transfektion .....	39
3.12.4 Lentivirale Infektion.....	40
3.12.5 Repotergenanalysen .....	40
3.13 TUNEL-Assay .....	42
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
4.1 Arsenit erhöht die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in SH-SY5Y Neuroblastomzellen..	45
4.2 Arsenit erhöht die Expression von c-Jun und p53 in SH-SY5Y-Zellen.....	47
4.3 Die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen und der induzierte Zelltod sind abhängig von p53.....	48
4.3.1 Die Expression einer verkürzten Mutante von p53 reduziert die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Arsenit-stimulierten Neuro-blastomzellen und schützt vor Apoptose.....	48
4.3.2 Die Expression einer p53-spezifischen shRNA reduziert die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuro-blastomzellen und schützt vor Apoptose.	51
4.4 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen durch Nutlin-3 ist abhängig von p53.....	54
4.5 Betulinsäure führt in Neuroblastomzellen unabhängig von p53 zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 .....	59
4.6 p53 ist in Arsenit- und Nutlin-3-stimulierten Neuroblastomzellen transkriptionell aktiv	61

4.7 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und die Induktion des programmierten Zelltods durch Arsenit wird in Neuroblastom-zellen nicht durch c-Jun reguliert .....	63
4.7.1 Die Expression der dominant-negativen Mutante von c-Jun reduziert weder die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 noch den induzierten Zelltod in Neuroblastomzellen.....	63
4.7.2 Die Expression einer c-Jun-spezifischen shRNA reduziert nicht die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuro-blastomzellen und schützt nicht vor Apoptose .....	67
4.8 Die konstitutiv-aktive Mutante von MEKK1 erhöht die Aktivität der Caspasen 3 und 7 über c-Jun .....	70
4.9 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit erfolgt in Neuroblastomzellen nicht über einen JNK-abhängigen Signalweg .....	72
4.9.1 Die Stimulation von Neuroblastomzellen mit Arsenit führt zur Phosphorylierung von c-Jun .....	72
4.9.2 Der Inhibitor der c-Jun N-terminalen Proteinkinase, SP600125, reduziert nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit.....	73
4.10 Arsenit führt in Neuroblastomzellen zu oxidativem Stress .....	74
4.10.1 N-Acetyl-L-Cystein verhindert in SH-SY5Y-Zellen die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 sowie die erhöhte Expression von p53 und c-Jun..	74
4.10.2 Arsenit erhöht in Neuroblastomzellen transkriptionell die Aktivität des Stress-responsiven Elementes .....	76
4.10.3 HO-1 schützt nicht vor einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen durch Arsenit.....	79

<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
5.1 Arsen in der Medizin .....	81
5.2 Der molekulare Mechanismus von Arsenit .....	82
5.2.1 Arsenit und Apoptose .....	82
5.2.1.1 Arsenit und Caspasen.....	82
5.2.1.2 Arsenit und p53.....	83
5.2.1.3 p53 im Arsenit-induzierten Zelltod: Translokation vs. Transkription.....	84
5.2.1.4 Arsenit, c-Jun und JNK .....	87
5.2.2 Arsenit und oxidativer Stress.....	89
5.3 Ausblick .....	90
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>7 PUBLIKATIONEN UND POSTER.....</b>	<b>105</b>
7.1 Publikationen .....	105
7.2 Poster .....	106
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>9 LEBENS LAUF .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
A. dest	Aqua destillatum
ARE	Antioxidativ-responsives Element
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5'triphosphat
BA	Betulinsäure
Bp	Basenpaare
BSA	"Bovine Serum Albumin"
bzw.	beziehungsweise
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	„Dulbecco´s modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	"Enhanced Green Fluorescent Protein"
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HO-1	Hämoxygenase-1
H <sub>2</sub> O	Wasser
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter



LTR	„long terminal repeat“
LU	lightunits
M	Mol
mA	Milliampere ( $10^{-3}$ A)
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ l)
min	Minute
Mio	Million
mM	Millimolar ( $10^{-3}$ M)
NaAsO <sub>2</sub>	Natriumarsenit
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NLS	„nuclear localization signal“
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
NQO1	NADPH-Quinon-Oxidoreduktase
Nrf2	NF-E2-Related Factor 2 (nuclear factor-erythroid 2)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	„phosphate-buffered saline“
pLL3.7	pLenitLox3.7
PUMA	„p53-up-regulated modulator of apoptosis“
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
StRE	Stress-responsives Element
TBS	„Tris-buffered saline“
TBST	„Tris-buffered saline“ + Tween 20
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
V	Volt
vs.	versus
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis von Gewicht zu Volumen

x g	x Erdbeschleunigung
μM	Mikromolar ( $10^{-6}$ M)
μl	Mikroliter ( $10^{-6}$ l)
z.B.	zum Beispiel

## 1 Zusammenfassung

Natriumarsenit ist das Natriumsalz von Arsentrioxid, einem Heilmittel der Traditionellen Chinesischen Medizin. In der westlichen Medizin erhielt Arsentrioxid durch die erfolgreiche Behandlung von Patienten mit Akuter Promyeloischer Leukämie (APL) neue Bedeutung und wird heutzutage auch bei anderen Leukämieformen eingesetzt. Neuroblastome sind Tumorerkrankungen bei Kindern und mit herkömmlichen Therapiemitteln schwer zu heilen. Wegen des großen Erfolges von Arsenit in der Behandlung der APL wird es auch zur Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt. Dabei wird die Wirkung von Arsenit in der Tumorthherapie mit einer Induktion des Zelltods in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass die Stimulation von humanen SH-SY5Y-Zellen mit Arsenit zu einer erhöhten Aktivität der Caspasen 3 und 7 und zum induzierten Zelltod führt. Die Stimulation mit Arsenit induziert dabei die Expression der Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wurde geklärt, ob die Transkriptionsfaktoren kausal am Arsenit-induzierten Zelltod in Neuroblastomzellen beteiligt sind. Die Expression einer p53-Mutante, die eine korrekte p53-Oligomerisierung unterband, verhinderte die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und konnte die Zellen vor dem Arsenit-induzierten Zelltod schützen. Die Reduktion der Expression von p53 durch die Expression einer spezifischen shRNA blockierte den Zelltod durch Arsenit. Die Resultate zeigen, dass p53 für den programmierten Zelltod durch Arsenit verantwortlich ist. Es gibt zwei Hypothesen, wie p53 in der Signaltransduktion wirkt. Zum einen wirkt p53 als transkriptioneller Aktivator, zum anderen aktiviert p53 über die Translokation zu den Mitochondrien. Dass die Expression der p53-Mutante die Zellen vor dem Zelltod durch Arsenit schützte, spricht für eine transkriptionell aktivierende Wirkung von Arsenit, da an der Translokation zur Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs p53-Monomere beteiligt sind. Außerdem aktivierte die Stimulation der Zellen mit Arsenit die Transkription eines p53-responsiven Reportergens. Hingegen konnte weder die Expression einer dominant negativen Mutante von c-Jun noch die Reduktion der Expression von c-Jun durch die Expression einer spezifischen shRNA die SH-SY5Y-Zellen vor dem Arsenit-induzierten Zelltod schützen. Daraus folgt, dass die durch Arsenit erhöhte Expression von c-Jun nicht kausal mit dem Arsenit-induzierten Zelltod in Neuroblastomzellen verknüpft ist.

## Summary

### **Activation of caspases and induction of cell death in neuroblastoma cells: the role of the tumor suppressor p53**

Sodium arsenite is the sodium salt of arsenic trioxide. Arsenic trioxide has been used since 2000 years in the Traditional Chinese Medicine. In western medicine arsenic trioxide has been used in the treatment of patients with relapsed acute promyelocytic leukemia (APL). The action of arsenite in the treatment of cancers has been connected with the induction of apoptosis, but the mechanism by which arsenite triggers apoptosis is still not solved and remains a matter of controversy. Because of the enormous success in the treatment of relapsed APL, arsenic trioxide is used even in the treatment of neuroblastoma, a childhood tumor which is difficult in treatment. In this study I have shown that the stimulation of human neuroblastoma cells with arsenite activated the caspases 3 and 7, key enzymes in the apoptotic signaling pathway. Arsenite-stimulation leads to the induction of cell death that is accompanied by elevated p53 and c-Jun levels. The expression of a truncated mutant of p53, that inhibits the oligomerization of p53, suppressed the caspase activation and the arsenite-induced cell death. These data were corroborated by knockdown experiments of p53 following expression of a p53-specific short hairpin RNA. To confirm these results, I analyzed the induction of cell death by nutlin-3, a potent activator of the p53 signaling pathway. Expression of either the p53 mutant or knockdown of p53 prevented activation of caspases 3 and 7 and induction of cell death. The biological functions of p53 are mediated through transactivation of p53-responsive genes, although a transcription-independent function has been proposed involving the translocation of p53 to the mitochondria. Experiments involving expression of p53DD exclude a mechanisms involving targeting p53 to the mitochondria, as this pathway requires monomeric p53. I have directly shown that either arsenite or nutlin-3 increased transcription of a p53-responsive reporter gene.

In contrast to p53, expression of a dominant negative mutant of c-Jun or the knockdown of c-Jun following expression of a c-Jun-specific short hairpin RNA failed to protect the cells against arsenite-induced cell death. However, caspase activation as a result of forced expression of a constitutively active mutant of MEKK1 could be reduced by RNAi.

In summary, these data demonstrates that caspase activation and induction of cell death in either arsenite or nutlin-3 stimulated neuroblastoma cells requires p53. A causal relationship

exists between p53 activation and caspase activation. However, the upregulation of c-Jun is not part of the apoptotic signaling cascade in arsenite-stimulated neuroblastoma cells.

## 2 Einleitung

### 2.1 Neuroblastome und ihre Behandlungen

Bei kleinen Kindern können im Nervensystem solide Tumore entstehen. 1910 klassifizierte der Pathologe J.H. Wright bei Kindern auftretende Tumore, in denen er neurale Fibrillen und Bündel scheinbar unreifer Zellen erkannte, als Neuroblastome (Øra und Eggert, 2011). Neuroblastome sind maligne Tumore, die aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems entstehen. In westlichen Ländern erkrankten in den Jahren von 1988 bis 1997 schätzungsweise 10,9 von 1 Millionen Kinder unter 15 Jahren, so dass eine von 7000 Lebendgeburten betroffen war (Spix et al., 2006). Dabei treten die meisten Fälle nicht familiär bedingt, sondern sporadisch auf. Da die Häufigkeit der neuroblastomeren Erkrankungen eher konstant bleibt, besteht die Hypothese, dass genetische Faktoren den größten Anteil an der Entwicklung dieser malignen Tumore haben (Brodeur GM, 2003; Maris JM, 2010). Ein wichtiges Onkogen, das in Neuroblastomzellen amplifiziert wird, ist *MYCN*. *MYCN* gehört zu der Familie der MYC-Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der Antwort auf DNA-Schaden, der Differenzierung und der Apoptose spielen (Speleman et al., 2011). *MYCN* wird zur Charakterisierung von Neuroblastomen eingesetzt, da ein hoher Gehalt an *MYCN* für ein aggressives Tumorverhalten und eine demnach niedrige Überlebensrate steht (Speleman et al., 2011). Offen ist dabei, wie die Neuroblastomzellen einem hohen *MYCN*-Gehalt entgegenwirken können, da bekannt ist, dass die Überexpression von *MYCN* teilweise über p53 zur Apoptose führt (Chen et al., 2010). Neuroblastome gelten aufgrund unterschiedlichster Verlaufsmöglichkeiten als unvorhersehbar in der Klinik. Zum einen neigen sie zu lebensbedrohender Progression. Zum anderen können sie zu Ganglioneuroblastomen oder Ganglioneuronen weiter auswachsen (Berthold und Hero 2000). Aber auch eine spontane Regression des Tumors ist möglich (Pritchard und Hickmann, 1994). Die modernen Behandlungsmethoden umfassen eine Kombination aus Chemotherapie, Operationen und Bestrahlung (Matthay et al., 1999; Pearson et al., 2008), wobei die Chemotherapeutika Kombinationspräparate aus alkylierenden Substanzen, Anthrazyklinen, Platinbestandteilen und Epipodenphyllotoxin darstellen. Oftmals werden die Tumore jedoch resistent gegen viele

Behandlungsbestandteile (Maris und Matthay, 1999). Trotz aller möglichen Behandlungsfortschritte haben die Patienten nur eine geringe Überlebensrate (Berthold und Hero, 2000) und weniger als 40% der Kinder können langfristig therapiert werden. Bei ungefähr 40% der diagnostizierten Fälle werden Neuroblastome zusammen mit metastatischen Erkrankungen diagnostiziert (Westermann und Schwab, 2002). So sterben viele Kinder, die durch Chemotherapeutika von ihrem Tumor geheilt wurden an einer Progression der Begleiterkrankungen (Lau et al., 2004). Und selbst als geheilt geltende Kinder haben ein hohes Risiko unter langzeitlichen Komplikationen wie Hörverlust, Herzdysfunktion, Unfruchtbarkeit und Zweitumoren zu leiden (Laverdière et al., 2005). Diese Fakten verdeutlichen, dass neue, die Überlebensrate erhöhende Therapien vonnöten sind (Wagner und Danks, 2009). Hierzu zählen auch unkonventionelle Methoden wie der Gebrauch von Retinoiden oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Ein weiterer Ansatz in der Behandlung dieser aggressiven kindlichen Tumoren ist der Gebrauch von Arsenit (Pettersen et al., 2007).

## 2.2 Arsen

Arsen ist ein Halbmetall. Meist kommt Arsen in drei- oder fünfwertiger Oxidationsstufe in mineralischer, selten in elementarer Form vor. Es gibt auch organische Arsenverbindungen. Die häufigsten Verbindungen sind gelbes Arsen ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), auch Orpiment genannt, rotes Arsen ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ), auch als Realgar bekannt, und das als weiße Arsen bekannte Arsentrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), das bei der Verbrennung von Realgar entsteht. Die Oxidationsstufen unterscheiden sich in ihrer Toxizität. Dreiwertiges Arsen inhibiert Enzyme, indem es an die Sulfhydrylgruppen bindet. Fünfwertiges Arsen ist ein Entkoppler der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (Miller et al., 2002). Arsen ist ein Umweltgift und gerade mit Arsen verseuchtes Trinkwasser ist ein Problem. Die Umweltbelastungen sind auf die Verwendung von arsenhaltigen Erzen in der Glas- und Keramikherstellung, sowie bei der Herstellung von Blei- und Kupferlegierungen und der Produktion von Mikrochips zurückzuführen. Bei der Langzeitbelastung mit arsenhaltigen Substanzen kommt es zu Lungenkrebs, Hauttumoren und Polyneuropathien (Tinwell et al., 1991).

## 2.3 Arsenhaltige Verbindungen in der Geschichte der Medizin

Arsenhaltige Verbindungen werden schon seit langem als Heilmittel verwendet (zum Überblick (Miller et al., 2002; Ravandi F 2004). Bei den Griechen im Altertum kamen arsenhaltige Verbindungen u.a. in der Behandlung von Geschwüren zum Einsatz. Die sogenannte Fowler'sche Lösung wurde im 18. Jahrhundert von Thomas Fowler entwickelt und galt damals als medizinisches Wundermittel gegen verschiedene Erkrankungen der Haut und bei Blutbildungsstörungen, aber auch als Fiebersenker. Zur Behandlung von Leukämien und Schuppenflechte wurde es bis Mitte des 20. Jahrhundert eingesetzt. Paul Ehrlich entwickelte Anfang des 20. Jahrhunderts Salvarsan, ein Medikament zur Behandlung der damals weit verbreiteten Syphilis. Es wurde auch in der Behandlung von Trypanosomiasis versuchsweise eingesetzt. Die Injektion von Salvarsan konnte jedoch zu Verätzungen von Venen und Muskelgewebe führen und wurde so durch das später entwickelte Penicillin und Folgemedikamente abgelöst. Auch in der Traditionellen Chinesischen Medizin finden arsenhaltige Verbindungen seit Jahrhunderten ihre Anwendung (Wu et al., 2011). Die Arsen-Schwefelverbindung  $\text{As}_4\text{S}_4$  kommt dort oral in der Behandlung von Syphilis und Arthritis zum Einsatz. Äußerlich angewendet hilft es bei Neurodermitis (Pettersson et al., 2007).

Die ersten Berichte, dass Arsentrioxid in der Therapie von Leukämien eingesetzt werden kann, stammen aus dem 19. Jahrhundert. Arsentrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) wird heute erfolgreich bei der Behandlung der Akuten Promyeloischen Leukämie (APL) eingesetzt (Shen et al., 1997; Soignet et al., 1998 und 2001). Die Zellen der APL und Neuroblastomzellen ähneln sich in ihrer Biologie (unreife Differenzierung, Entstehung im sympathischen Nervensystem, Expression von Bcl-2) (Øra et al., 2000), deshalb wird das in der Behandlung der APL mit Erfolg verwendete Arsentrioxid auch zur Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt (Akao et al., 1999; Øra et al., 2000).

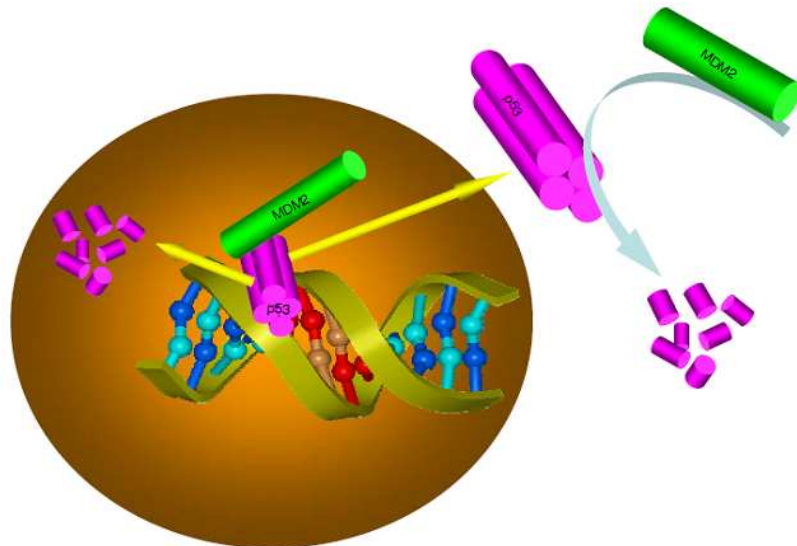


## 2.4 Arsenit und der Arsenit-induzierte Zelltod

Natriumarsenit ( $\text{NaAsO}_2$ ) ist das Natriumsalz von Arsentrioxid und scheint durch seine Fähigkeit, Apoptose auszulösen, als Antitumorthapeutikum geeignet zu sein (Shao et al 1998). Auch in anderen Zelltypen wie Neuronen, Fibroblasten und Lymphozyten führt Arsenit zur Apoptose (Chen et al., 1998; Zhu et al., 1999; Namgung und Xia, 2000). Die genaue Signalkaskade, die bei Stimulation der Zellen mit Arsenit zum Zelltod führt, ist jedoch nur z.T. bekannt. Dabei werden zwei Hauptwege in Betracht gezogen. Für manche Arbeitsgruppen ist die erhöhte Expression des Tumorsuppressors p53 der Schlüssel für den Arsenit-induzierten Zelltod (Yih und Lee, 2000; Jiang et al., 2001; Wong et al., 2005). Dies wird von anderen Arbeitsgruppen aber in Zweifel gezogen und stattdessen eine Vermittlung der Signalkaskade über die c-Jun N-terminale Kinase JNK und den Transkriptionsfaktor c-Jun für essentiell erachtet (Huang et al., 1999; Namgung und Xia, 2000).

## 2.5 Die Rolle von p53 im programmierten Zelltod

Der Transkriptionsfaktor p53 wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet, da er im Falle von DNA-Schädigung und anderem Stress einen Zellzyklusarrest bewirkt und so die DNA-Reparatur entweder ermöglicht oder aber die Apoptose weiter einleiten kann (Lane DP, 1992; Vogelstein et al., 2000). p53 wird durch die Interaktion mit dem *mouse double minutes* 2-Protein (MDM2) reguliert (Abbildung 1). p53 wird unter normalen Bedingungen nur wenig exprimiert (Becker et al., 2007). Es liegt als Tetramer im Zellkern vor und aktiviert die Expression des MDM2-Gens, welches im Gegenzug p53 aus dem Kern schleust und als E3-Ubiquitinligase zum Abbau von p53 führt. Bei Stress unterbricht die Interaktion zwischen den beiden Proteinen und p53 kann seine Rolle als Aktivator der Transkription erfüllen.



**Abbildung 1: Die Regulation von p53 durch MDM2.**

Unter normalen Bedingungen führt p53 zur Expression des *mouse double minute 2*-Gens (MDM2). Der Komplex aus MDM2 und p53 verlässt den Zellkern, so dass p53 im Zytosol abgebaut werden kann. Bei Stress unterbricht die Interaktion zwischen den beiden Proteinen und es kommt zur Akkumulation von p53 im Nukleus. p53 kann dann die Transkription seiner Zielgene aktivieren (Deng et al., 2006).

Die p53-Expression wird durch unterschiedliche Stressoren hochreguliert. Dazu zählen u.a. DNA-Schäden, Hypoxie und oxidativer Stress (Morrison et al., 2003).

In vielen Krebsarten liegt eine Mutation des p53 vor (Olivier et al., 2003; Green und Kroemer, 2009). So werden die natürlichen Reparaturmechanismen der Zellen außer Kraft gesetzt und die Tumore können sich abnorm weiterentwickeln. In Studien, in denen transgene Mäuse verwendet wurden, konnte eine Erneuerung des funktionellen p53 *in vivo* zur Regression der Tumore führen (Martins et al., 2006; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). In Neuroblastomen liegt selten eine mutierte Form des p53 vor und die hier untersuchten SH-SY5Y-Zellen exprimieren die Wildtypform von p53 (Paulsen et al., 2006).

Das durch Stress aktivierte p53 reguliert die Transkription seiner Zielgene wie z.B. p21, Bax, Puma, Noxa und Killer (Green und Kroemer, 2009; Vousden und Prives, 2009). Seit Mitte der Neunziger Jahre wird ein alternativer p53-abhängiger Apoptoseweg diskutiert, bei dem p53 nicht über die Transkription seiner Zielgene zum Zelltod führt. Vielmehr kommt es zu einer Translokation des zytoplasmatischen p53 zu den Mitochondrien. Durch die Translokation von p53 kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Dabei werden pro-apoptotische Faktoren wie z.B. der Apoptose-induzierende Faktor AIF und Cytochrom c freigesetzt und Caspasen aktiviert, so dass es letztendlich zum induzierten Zelltod kommt (zum Überblick Green und Kroemer, 2009; Vaseva und Moll, 2009; Speidel D, 2010).

### **2.6 Die Rolle von JNK und c-Jun im programmierten Zelltod**

c-Jun gehört zu der Familie der AP(activator protein)-1-Transkriptionsfaktoren, die Leucin-Zipper-Proteine mit einer basischen Region, bZIP-Proteine, genannt werden (Vinson et al., 1989). Diese Proteine besitzen N-terminal eine Region basischer Aminosäuren zur sequenzspezifischen DNA-Bindung. C-terminal befindet sich eine amphipathische Sequenz, mit einem Leucin an jeder siebten Stelle. An diesem sogenannten Leucin-Zipper (Landschultz et al., 1988) kommt es zur Dimerisierung der einzelnen Monomere (Baxevis und Vinson, 1993). Die bZIP-Proteine können nur als Dimere an die DNA binden und die Transkription regulieren (Hurst HC, 1995). Die c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) aktiviert c-Jun mittels Phosphorylierung (Ham et al., 2000), während Phospho-c-Jun wiederum die Transkription von c-Jun erhöht.

Die JNK Proteinkinase wird auch Stress-aktivierte Proteinkinase genannt (SAPK), da sie durch unterschiedliche Stressoren aktiviert wird. Hierzu gehören Zytokine, UV-Bestrahlung, Hitzeschock und osmotischer Schock sowie die Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Galcheva-Gargova et al., 1994; Minden et al., 1994; Huang et al., 2009). In neuronalen Zellen und anderen Zelltypen leitet die aktivierte JNK die Apoptose ein. In PC12-Zellen führt der Entzug des Wachstumsfaktors NGF zur Aktivierung von JNK und zum Zelltod (Le-Niculescu et al., 1999). In JNK3<sup>-/-</sup>-Mäusen sind Neurone vor dem Kainat-induzierten Zelltod geschützt (Yang et al., 1997). Die Überexpression von c-Jun ist ein

Auslöser der Apoptose in sympathischen Neuronen (Ham et al., 1995). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Rolle von JNK im induzierten Zelltod abhängig vom Zelltyp und vom Stimulus ist (Übersicht in Liu und Lin, 2005). So führte die UV-Bestrahlung von JNK1<sup>-/-</sup>-Fibroblasten nicht zum Zelltod (Liu et al., 2004). Allerdings scheint der JNK1-abhängige UV-induzierte Zelltod der Fibroblasten nicht von c-Jun abhängig zu sein, da die Zellen nicht durch Inhibitoren der Protein- oder mRNA-Synthese geschützt werden konnten (Tournier et al., 2000). Die Fibroblasten von c-Jun-negativen-Mäusen dagegen sind insensitive für UV-Bestrahlung, so dass hier die Aktivierung von c-Jun eine Rolle im induzierten Zelltod spielt (Behrens et al., 1999).

### **2.7 Ziel der Arbeit**

Da Arsenit eine so große Rolle in der Behandlung von Leukämien spielt und inzwischen auch in der Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt wird, sollte die Wirkungsweise bei Neuroblastomen, hier exemplarisch an der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, genauer untersucht werden. Dabei sollte die Arbeit die molekularen Mechanismen aufklären, die beim Arsenit-induzierten Zelltod sowie an der induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 beteiligt sind. Durch eine Aufklärung der genauen Signalwege könnte Arsenit als Therapeutikum zielgerichteter eingesetzt und eventuell auftretende Nebenwirkungen umgangen werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte

Autoklav	Schütt, Göttingen
Behälter für Flüssigstickstoff	diverse Hersteller
Blottingapparatur	Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, USA
Brutschränke	diverse Hersteller
Einfrierhilfe „Mr. Frosty“	Nalgene®Labware, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA
Eismaschine	diverse Hersteller
Entwicklermaschine Gevamic für Röntgenfilme	Agfa-Gevaert, München
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kamera CC12	Soft imaging system Münster GmbH, Münster
und Software Analysisdoc	Olympus Soft imaging Solutions GmbH
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
und Software Simplicity 2.1	
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter inoLab pH 720	WTW, Weilheim
Mikroskop Wilovert S	hund, Wetzlar
Milliporewasser-Anlage Milli Q	Waters-Millipore, Milford, USA
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Gießapparatur für SDS-Polyacrylamidgele, Glasplatten, Kämme, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen)	Bio-Rad, München
Multikanalpipette	VWR, Darmstadt
Neubauer Zählkammer improved	Marienfeld, Bad Mergentheim
Photometer Eppendorf Biophotometer	Eppendorf, Hamburg

Photometer Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
und Software Microplate Manager PC Version 4.0	
Pipetten (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
	Eppendorf, Hamburg
Pipetus ®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Röntgenfilmkassette	Molecular Dynamics, München
Rotoren für Kühlzentrifuge J2-HS: JA.10, Ja.20	Beckman, München
Spannungsgeräte für SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbäder, temperierbar	diverse Hersteller
Wipptische	Fröbel, Wasserburg
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Spitzen (max. 200 µl bzw. max. 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen Injekt (10 ml, 20 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim, Deutschland
Nitrozellulosemembran BioTrace NT Membrane (100% Nitrozellulose)	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA
Petrischalen mit Nocken (35x15 mm und 60x15 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen) 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen) 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
96-Loch-Platte weiß	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Loch-Platte durchsichtig	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Platte, beschichtet	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter Filtropur L 0,2 LS	Sarstedt, Nürnberg
Whatman 3MM-Papier	Whatman, Maidstone, UK
Zellkulturflaschen in den Größen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 3.3 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Hamburg
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Coenzym A	Sigma-Aldrich, München
Complete Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAA, Marburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR, Darmstadt
FCS	Biochrom, Berlin
Glutamin	PAA, Marburg
Glycerin	Biomol, Hamburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver Slim Fast	Allpharm-Vertrieb GmbH, Messel
Magnesiumhydroxidcarbonat ( $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker (prestained)	Fermentas, St.Leon-Rot
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, München
ortho-Phosphorsäure 85%	Roth, Karlsruhe
para-Coumarsäure	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	PAA; Marburg
Polybrene	Sigma-Aldrich, München
Polyvinylalkohol	Roth, Karlsruhe
Ponceau-S	Roth, Karlsruhe
Reporterlysepuffer	Promega, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tricine	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe



Trypsin/EDTA 10X  
Tween20

PAA, Marburg  
Roth, Karlsruhe

### 3.4 verwendete Stimuli

**Natriumarsenit (NaAsO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich # S 7400):** Eine 5 mM Stocklösung wurde mit H<sub>2</sub>O Millipore angesetzt und bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration im DMEM mit 1% FCS betrug 5 µM.

**Nutlin-3 (Sigma-Aldrich # S 6287):** Eine 7,5 mM Stocklösung wurde mit DMSO angesetzt und bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration im DMEM mit 1% FCS betrug 10 µM.

**Betulinsäure (BA) (Sigma-Aldrich # 855057):** Die Stocklösung (4 mg/ml) wurde mit DMSO angesetzt und bei 4 °C gelagert. Die Endkonzentration im DMEM mit 1% FCS betrug 10 µg/ml).

**N-Acetylsphingosine (C<sub>2</sub>-Ceramide) (EnzoLifeSciences # SL-100):** Eine 50 mM Stocklösung wurde mit DMSO angesetzt und bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration betrug im DMEM mit 1% FCS 25 µM.

### 3.5 verwendete Inhibitoren

**N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (Sigma-Aldrich # A 8199):** Eine 0,1 M Stocklösung wurde mit H<sub>2</sub>O Millipore frisch vor der Stimulation angesetzt. Die Endkonzentration im DMEM mit 1% FCS betrug 5mM. Die Vorinkubation dauerte 30 Minuten.

**SP600125 (Alexis # 270-339):** Eine 20 mM Stocklösung wurde mit DMSO angesetzt und bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration im DMEM mit 1 % FCS betrug 5 µM. Die Vorinkubation dauerte 30 Minuten.

### 3.6 Standardlösungen

Die hier aufgelisteten Standardpuffer, Lösungen und Nährmedien wurden, soweit nicht anders genannt, mit H<sub>2</sub>O Millipore hergestellt.

#### **Ammoniumpersulfat (APS)**

Eine 10%ige (w/v) Ammoniumpersulfatlösung wurde hergestellt und bei 4 °C gelagert.

#### **Complete Protease Puffer**

1 Tablette wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O Millipore in Lösung gebracht, aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

#### **Dithiothreitol (DTT)**

Eine 100 mM Lösung wurde aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

#### **DMEM („Dulbeccos modified eagle medium“)**

66,9 g DMEM

18,5 g NaHCO<sub>3</sub>

wurden in 5 Liter H<sub>2</sub>O Millipore gelöst.

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde in 450 ml Aliquots steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

#### **10% Natriumdodecylsulfat (SDS)**

10% Natriumdodecylsulfat (w/v) wurden gelöst und bei RT aufbewahrt.

#### **NP40**

Eine 10%ige Nonidet P40-Lösung (v/v) wurde hergestellt und bei RT gelagert.

#### **1x „Phosphate-buffered saline“ (PBS)**

170 mM	NaCl
3,35 mM	KCl
4 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
1,84 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Die Salze wurden in H<sub>2</sub>O Millipore gelöst und der pH auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde in 500 ml Flaschen autoklaviert und bei RT gelagert.

#### **Tris-HCl**

1M Tris

Der pH-Wert wurde mit rauchender Salzsäure auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei RT gelagert.

#### **10x „Tris buffered saline“ (TBS)**

10 mM Tris-HCL, pH 8,0  
150 mM NaCl

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

#### **1xTBS**

100 ml 10xTBS  
900 ml A. dest  
0,05% Tween® (v/v)

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

#### **Trypsin-EDTA**

Die 10x Stocklösung wurde mit 1XPBS 1:10 verdünnt und in Aliquots bei –20 °C eingefroren. Die gerade gebrauchten Aliquots wurden bei 4 °C gelagert.

### 3.7 Antikörper

Die Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden alle in 1xTBST mit 4% Magermilchpulver (w/v) angesetzt.

#### Primärantikörper:

- Purified Mouse Anti-Human PARP (BD Pharmingen™, # 556494), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Mouse.
- p53 (DO-1) mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, # sc-126), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Mouse.
- c-Jun (H-79) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, # sc-1694), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Rabbit.
- Anti-phospho-c-Jun (Ser73) polyclonal antibody (Millipore, # 06-659), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Rabbit.
- HDAC1 (10E2) mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, # sc-81598), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Mouse.
- Anti-GFP polyclonal antibody (Roche, # 11 814 460 001), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Mouse.
- Anti-Flag® M2 Monoclonal Antibody (Sigma-Aldrich, # F 3165), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Mouse.
- Anti-HO-1 (Hsp32) Polyclonal Antibody (Stressgen, # SPA-895), der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper diente Goat-Anti-Rabbit.

### **Sekundärantikörper:**

- Goat-Anti-Maus IgG polyclonal antibody (Sigma-Aldrich, # A 4416), der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 10000 eingesetzt.
- Goat-Anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich, # 111-035-003), der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

## **3.8 Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien wurden ausschließlich in DMEM mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 100 mg/ml Glutamin kultiviert.

**SH-SY5Y:** Diese humane Neuroblastomazelllinie ist ein Klon der SK-N-SH Zelllinie, die original aus einem metastasierenden Neuroblastom eines Mädchens isoliert wurde (Biedler et al., 1973). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von J. Biedler (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Auch wurden Zellen der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet.

**293T/17:** Diese humane embryonale Nierenzelllinie wurde freundlicherweise von D. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

## **3.9 Zellkultur**

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größe 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup> kultiviert. Bei dem Nährmedium handelte es sich, soweit nicht anders angegeben, um DMEM mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 100 mg/ml Glutamin. Für die verschiedenen Stimulationen wurden die Zellen 24 h vor der Stimulation in DMEM mit 1% FCS, 100 µg/ml

Streptomycin/Penicillin und 100 µg/ml Glutamin, so genannten serumreduzierten DMEM, kultiviert.

Im eingesetzten Brutschrank herrschte eine Temperatur von 37 °C, die feuchte Atmosphäre war mit 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) versetzt. Die Kultivierung sowie die weitere Behandlung der Zellen bis zur Ernte erfolgten unter der Sterilbank.

### **3.9.1 Passagieren eukaryotischer Zellen**

Das Medium wurde von den Zellen mit einer Glaspipette abgenommen und der Zellrasen mit 1xPBS gewaschen. Für große Zellkulturflaschen wurden 15 ml 1xPBS, bei mittleren Zellkulturflaschen 10 ml 1xPBS verwendet. Das PBS wurde durch leichtes Schwenken über dem Zellrasen verteilt und anschließend ebenfalls mit einer Glaspipette abgenommen. Zum Lösen der Zellen wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% (w/v) Trypsin, 0,1% (w/v) EDTA) verwendet. Für große Zellkulturflaschen wurden 2-3 ml, bei mittleren 1-2 ml Trypsin eingesetzt. Die Zellen wurden mit dem Trypsin inkubiert, bis die Zellen begannen sich abzulösen. Danach wurden die Zellen mit einer Glaspipette vereinzelt und mit etwas Nährmedium vermischt. Ein Teil dieses Zell-Medium-Gemischs wurde in der Kulturflasche belassen und mit Nährmedium auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Das restliche Zell-Medium-Gemisch wurde verworfen.

### **3.9.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen**

Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Die gelösten Zellen wurden mit etwas Medium gemischt, in ein 15 ml Falcon überführt und für 3 min bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit fötalem Kälberserum (FCS) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in vorgekühlte Kryo-Röhrchen aliquotiert und über Nacht bei -80 °C im vorgekühlten „Mr. Frosty“ eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryo-Röhrchen dann in den flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.

### 3.9.3 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und die Zellen mit DMEM in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde 2 Minuten bei 4 °C und 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in DMEM resuspendiert. Das Zellgemisch wurde dann, je nach Pelletgröße, in eine kleine bzw. eine mittlere Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

### 3.9.4 Aussäen eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und mit der Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM in ein 50 ml Falcon überführt und mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer die Zellzahl bestimmt. Dabei wurden zwei große 16er Quadrate ausgezählt. Der Mittelwert ergab die Zellzahl  $\cdot 10^4$ /ml DMEM. Danach wurde in 35 bzw. 60 mm Kulturschalen die entsprechende Menge an Zellsuspension dazugegeben und mit DMEM auf 2 bzw. 4 ml bei 60 mm Schalen aufgefüllt. Die Schalen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Es wurden folgende Zelldichten ausgesät:

#### **SH-SY5Y:**

- Präparation der Kernproteine: zwei 60 mm Kulturschalen à 2 Mio Zellen, die bei der Ernte vereinigt wurden.
- Analyse im Caspase 3/7- oder Reportergenassay: 4er Ansätze in 35 mm Kulturschalen à 0,4-0,5 Mio Zellen
- Nachweis der Transgene: eine 60 mm Kulturschale à 1 Mio Zellen
- Bestimmung der Apoptoserate im TUNEL-Assay: in 96-Loch-Platte à 27000 Zellen

#### **293T/17:**

- Produktion des lentiviralen Überstandes durch Kalzium-Phosphat-Transfektion: 60 mm Kulturschalen à 2 Mio Zellen

### 3.9.5 Stimulation eukaryotischer Zellen

Den ausgesäten Zellen wurde nach 24 h das Medium abgesaugt und durch serumreduziertes Medium, DMEM mit 1% FCS, ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium wiederum abgesaugt und durch serumreduziertes Medium mit der gewünschten Konzentration des jeweiligen Stimulus ersetzt. Auf 35 mm Schalen kamen 1-1,5 ml Medium, auf 60 mm Schalen erfolgte die Stimulation in 2 ml Medium. Die Inkubation erfolgte je nach Zeitreihe.

Bei der Stimulation mit TPA wurden die Zellen nach dem Aussäen 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium direkt durch DMEM ohne FCS ersetzt. Dadurch war ein FCS-Gehalt von 0,05% gewährleistet.

### 3.9.6 Ernte eukaryotischer Zellen

Die Ernte und alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Damit wurde ein Proteinabbau verhindert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen direkt im Medium mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Dadurch wurden keine Zellen durch einen Waschschrift mit 1xPBS verloren. Bei 35 mm Kulturschalen wurde die Zell-Medium-Suspension direkt in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 4 °C und 16000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets mit 1 ml eiskaltem 1xPBS gewaschen, wiederum 5 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt. Bei 60 mm Kulturschalen wurde die Suspension in 15 ml Falcons überführt und in der Kühlzentrifuge 5 min bei 4 °C und 201 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml eiskalten 1xPBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in der Tischzentrifuge 5 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt.

Danach konnten die Pellets weiter aufgearbeitet werden.



## 3.10 Proteinbiochemische Methoden

### 3.10.1 Ganzzelextrakt

Das nach der Ente erhaltene Zellpellet wurde in 40 µl Lysepuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Reaktionsgefäße zwischendurch mehrfach über ein Drahtgestell gezogen, um die Zellen weiter aufzuschließen. Danach wurden die Zellen 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. 2 µl des Überstandes wurde für die Bestimmung des Proteingehalts nach 3.10.4 verwendet. Der restliche Extrakt wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß im gleichen Volumen 2xSDS-Stopp-Puffer (9 Vol SDS-Stopp-Puffer (Stocklösung), 1 Vol β-Mercaptoethanol) aufgenommen und auf Eis gelagert.

#### Lysepuffer

10 mM	Tris pH8
1mM	EDTA
400	mM NaCl
10%	Glycerol (v/v)
0,5%	NP40 (v/v)
1 mM	DTT
40 µl/ml	Complete

Die aus Tris, EDTA, NaCl und Glycerin bestehende Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert. DTT, NP40 und Complete wurden vor Gebrauch dazugegeben.

#### 2xSDS-Stopp-Puffer (Stocklösung)

125 mM	Tris, pH 6,8
3 mM	EDTA
20%	Glycerin (v/v)
9%	SDS (w/v)
0,05%	Bromphenolblau (w/v)

### 3.10.2 Kernextrakt

Aus den geernteten Zellpellets konnten nun durch eine Extraktion der Zellkerne die Kernproteine nachgewiesen und analysiert werden. Die Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Pellets wurden je nach Größe in 100 – 200 µl Puffer A resuspendiert und zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Anschließend wurden die Pellets in 25-35 µl Puffer C resuspendiert und zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Reaktionsgefäße zwischendurch mehrfach über ein Drahtgestell gezogen, um die Zellen weiter aufzuschließen. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Je 2 µl der Extrakte wurden für die Proteinbestimmung nach 3.10.4 verwendet.

Die restlichen Extrakte wurden im gleichen Volumen 2xSDS-Stopp-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

#### Puffer A:

10 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	KCl
0,5 mM	DTT
0,5%	NP40 (v/v)
40 µl/ml	Complete

Die aus HEPES-KOH, MgCl<sub>2</sub> und KCl bestehende Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert. DTT, NP40 und Complete wurden vor Gebrauch dazugegeben.

### Puffer C:

10 mM	HEPES-KOH, pH7,9
25%	Glycerin (v/v)
420 mM	NaCl
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	EDTA
0,5 mM	DTT
40 µl/ml	Complete Protease Puffer

Die aus HEPES-KOH, Glycerin, NaCl, MgCl<sub>2</sub> und EDTA bestehende Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert. DTT und Complete wurden vor Gebrauch dazugegeben.

### **3.10.3 Zytoplasmaextrakt**

Um zytoplasmatische Proteine nachweisen zu können, wurden die Zellpellets wie bei dem unter 3.10.2 beschriebenen Kernextrakt mit Puffer A aufgeschlossen. Dabei wurden die Reaktionsgefäße zwischendurch mehrfach über ein Drahtgestell gezogen, um die Zellen weiter aufzuschließen. Nach der 20minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 4° C und 16000 x g zentrifugiert. Dann wurden die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Je 2 µl der Extrakte wurden für die Proteinbestimmung nach 3.10.4 verwendet.

Die restlichen Extrakte wurden im gleichen Volumen 2xSDS-Stopp-Puffer (9 Vol SDS-Stopp-Puffer (Stocklösung), 1 Vol β-Mercaptoethanol) aufgenommen und auf Eis gelagert.

### 3.10.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts des Kernextraktes wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet.

Dabei wurden die BSA-Standards in den Konzentrationen 0/ 125/ 250/ 500/ 750/ 1000/ 1500 und 2000 µg/ml für die Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Die Proben wurden auf eine transparente 96-Loch-Platte pipettiert. Von den Standards wurden jeweils 10 µl aufgetragen und mit 2,5 µl des Puffers C vermischt. Die Proben wurden 1:6 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zu den Proben wurde je 80 µl des frisch nach Protokoll hergestellten BCA-Reagenz gegeben. Als Blank diente der Puffer C. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Abkühlung auf RT wurde die Platte im Micro-Plate Reader eingelegt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 567 nm gemessen. Die Auswertung der Proteinkonzentrationen erfolgte automatisch am PC. Um gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen, wurden aus der Proteinkonzentration die entsprechenden Volumina errechnet.

### 3.10.5 Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, durchgeführt. Für eine bandenscharfe Auftrennung wurde ein engporiges Trenngel genutzt, über dem ein weitporigeres Sammelgel gegossen wurde. Aufgrund der hier untersuchten Proteine wurden 10%ige Trenngele verwendet.

In einer Minigelkammer wurde zuerst ein Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Somit erhielt das Trenngel eine glatte Kante zum späteren Sammelgel. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel darüber gegossen und ein Gelkamm eingesteckt.

#### Zusammensetzung des Trenngels:

4,3 ml	H <sub>2</sub> O
3,3 ml	Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphorese® Gel 30, Roth)
2,5 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
100 µl	10% SDS (w/v)
100 µl	APS
20 µl	TEMED

#### Zusammensetzung des Sammelgels:

3,2 ml	H <sub>2</sub> O
0,6 ml	Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphorese® Gel 30, Roth)
1,25 ml	0,5 M Tris, pH 6,8
50 µl	10% SDS (w/v)
200 µl	APS
20 µl	TEMED

#### **Durchführung der SDS-PAGE**

Für den Gellauf wurde 1xLaufpuffer verwendet. Die auf Eis gelagerten Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95 °C gekocht, um mögliche Proteasen zu deaktivieren. Anschließend wurden die Proben 30 sec bei 12000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Es wurden 10-20 µg Protein auf die Gele geladen. Mit den Proben wurden vorgefärbte Proteine bekannter Größe als Marker aufgetragen (Prestained Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas).

#### Laufpuffer (10x Stocklösung):

250 mM	Tris
2,5 M	Glycin
1 %	SDS (w/v)

Solange die Proteinwand sich im Sammelgel befand, lag an der Minigelkammer eine Spannung von 70 V an. Sobald die Proteinwand sich im Trenngel befand, wurde die anliegende Spannung auf 90 V erhöht.

### 3.10.6 Western Blot von SDS-Gelen

Die aufgetrennten denaturierten Proteine wurden per Flüssigtransfer-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu spannte man das Gel und die Membran in folgender Reihenfolge in eine „Sandwich-Mappe“ ein: Schwamm, 3 Lagen Whatman-Papier, Membran, Gel, 3 Lagen Whatman-Papier und wieder ein Schwamm. Dabei wurden die Schwämme, das Papier und die Membran zuvor in Transferpuffer angefeuchtet. Das Sandwich wurde mit der Gelseite zur Kathode hin orientiert in die Blottingapparatur gespannt. Der Blot wurde bei 200 mA durchgeführt und dauerte etwa zwei Stunden.

#### Transferpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1%	SDS (w/v)
20%	Methanol (v/v)

### 3.10.7 Proteinfärbung mit Ponceau-S

Zur Überprüfung der weitestgehend vollständigen Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, wurde die Membran nach dem Blotten mit Ponceau-S gefärbt. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten ungefähr 5 min in destilliertem Wasser inkubiert. Danach wurde die Membran in der Gebrauchslösung für ungefähr 2 min gefärbt. Anschließend wurde die Membran in 1xTBST entfärbt. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde das Ponceau-S Konzentrat 1: 20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

### 3.10.8 Immunzytochemischer Nachweis der Proteine

Nach der Entfärbung wurde die Membran in Blocking Solution (4% Magermilchpulver (w/v) in 1xTBST) für 30 min bei RT inkubiert. Damit wurde das Binden unspezifischer Bindungsstellen verhindert. Anschließend wurde die Membran entweder 2 Stunden auf einem Wipptisch bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert

(Konzentration s. 3.7 Antikörper). Die ungebundenen Primärantikörper wurden durch Waschen der Membran mit 1xTBST entfernt. Dann erfolgte die Inkubation der Membran im Sekundärantikörper für 90 Minuten bei RT. Der Sekundärantikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Auch hier wurden ungebundene Antikörper nach der entsprechenden Inkubationszeit durch Waschen mit 1xTBST entfernt. Anschließend konnte der gebildete Komplex aus Protein, Primärantikörper und Sekundärantikörper durch selbst hergestelltes Ecl detektiert werden.

Dazu wurde zunächst die mit Whatmanpapier getrocknete Membran mit 1 ml Ecl-Gebrauchslösung (1 Vol Ecl1, 1 Vol Ecl2) inkubiert. Anschließend wurde unmittelbar die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Fuji-Film) detektiert. Die Exposition wurde der Signalstärke angepasst.

#### Ecl1:

100 mM Tris, pH 8,5

2,5 mM Luminol

400 µM para-Coumarsäure

#### Ecl2:

100 mM Tris, pH 8,5

5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## **3.11 Analyse der Caspase-3/7 Aktivität**

### **3.11.1 Caspase-Assay**

Die Caspasen 3 und 7 sind Effektorcaspasen in der apoptotischen Signalkaskade. Der Analyse der aktiven Caspasen 3 und 7 kann als Nachweis der Caspase-3/7-vermittelten Apoptose dienen.

Zur Bestimmung der Caspase-3/7 Aktivität wurde das Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Das Protokoll wurde nach Angaben von Dr. med. Heike Bantel, Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Universität Hannover abgewandelt.

Die geernteten Zellen wurden mit dem Lysepuffer aufgeschlossen und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 16000 xg. Dann wurden die Überstände in neue 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Je 2,5 µl der Extrakte wurden für die Proteinbestimmung nach 3.11.2 verwendet. Die Extrakte wurden in neuen 1,5 ml Reagiergefäßen auf 1 µg/µl mit Lysepuffer verdünnt (dadurch gleicht in jeder Probe das Verhältnis von Lysepuffer zu Proteinpuffer) und anschließend in wieder neuen 1,5 ml Reagiergefäßen auf 100 ng/µl mit Proteinpuffer verdünnt. Von dieser letzten Verdünnung wurden 10 µl mit 10 µl angesetzten Caspase-Substrat auf eine weiße 96-Loch-Platte pipettiert und bei RT eine Stunde abgedunkelt inkubiert. Zuletzt erfolgte die Messung der Lichtabgabe im Luminometer. Die gemessenen Lichteinheiten (LU) ergaben dabei die relative Caspase-3/7 Aktivität.

Die Messung erfolgte in Vierfachansätzen. Aus den vier Einzelergebnissen wurden der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung gebildet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Balkendiagramm.

#### Caspase-Substrat:

Das lyophilisierte Caspase-Substrat wurde nach Angaben des Herstellers im dazugehörigen Substratpuffer gelöst und in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen aliquotiert. Diese Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Zur Messung wurde das Caspase-Substrat bei RT aufgetaut.



#### Lysepuffer:

10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 mM	NaCl
10 mM	DTT
0,5%	NP40 (v/v)
40 µl/ml	Complete

Die aus Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> und NaCl bestehende Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert. DTT, NP40 und Complete wurden vor Gebrauch dazugegeben.

#### Proteinpuffer:

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
10 mM	KCl
5%	Glycerin (v/v)

Der Proteinpuffer wurde bei 4 °C gelagert.

#### **3.11.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual, Bio-Rad, München.

Dabei wurden die BSA-Standards in den Konzentrationen 0/ 125/ 250/ 500/ 750/ 1000 und 1500 µg/ml für die Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Die Proben wurden auf eine transparente 96-Loch-Platte pipettiert. Von den Standards wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Die Proben wurden 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zu den Proben wurde je 250 µl der gebrauchsfertigen Bradford-Lösung gegeben. Als Blank diente der Lysepuffer (1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt). Anschließend wurde die 96-Loch-Platte bei RT für 5 Minuten inkubiert. Die Platte wurde im Micro-Plate Reader eingelegt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 567 nm gemessen. Die Auswertung der Proteinkonzentrationen erfolgte automatisch am PC.

### Bradford-Reagenz:

0,01 g	Coomassie Brilliant Blue G-250
5 ml	EtOH

Der Farbstoff wurde in Ethanol gelöst. Die überschüssigen Farbpartikel wurden mit einem 0,45 µm Spritzenfilter herausfiltriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und vor Ansatz der gebrauchsfertigen Lösung auf RT erwärmt.

### Gebrauchsfertige Lösung:

500 µl	Bradford-Reagenz
1 ml	ortho-Phosphorsäure
8,5 ml	H <sub>2</sub> O Millipore

Die gebrauchsfertige Lösung konnte im Kühlschrank zwei Wochen gelagert werden. Die Lösung musste vor der Zugabe auf die 96-Loch-Platte auf RT gewärmt werden.

## 3.12 Manipulation eukaryotischer Zellen

### 3.12.1 Gentransfer mittels Lentiviren

Zu der Gruppe der Retroviren gehören die Lentiviren. Diese sind in der Lage teilungsfähige und postmitotische Zellen zu infizieren und eignen sich daher optimal für den Gentransfer in verschiedene Zelllinien. Die rekombinanten Lentiviren basieren auf dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV)-Provirus. Der HIV-Provirus besteht aus den drei Strukturgenen *gag*, *pol* und *env*. Das *gag*-Gen (*group-specific antigen*) kodiert für die virale Kernstruktur, das Kapsid. Das *pol*-Gen (*polymerase*) kodiert für die reverse Transkriptase. Das *env*-Gen (*envelope*) kodiert für das Hüllprotein. Die Strukturgene werden zusammen mit den für akzessorische Proteine kodierenden Genen von zwei endständigen Sequenzen, den "Long Terminal Repeats" (LTR) flankiert. Diese schützen die revers transkribierte DNA vor hydrolytischem Abbau und fördern die Integration ins Wirtsgenom. Das LTR am 5'-Ende

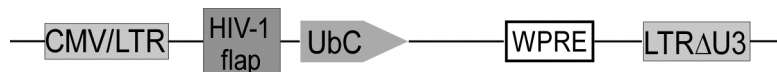
agiert als starker Promotor, der die Transkription viraler Gene unterstützt. Zu den akzessorischen Proteinen gehören zum Beispiel *tat*, das ein starker positiver Regulator der Transkription ist, und *rev*, das den Export von ungespleißter RNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma unterstützt. Diese akzessorischen Elemente sind für die Replikation nicht essentiell. Das Verpackungssignal  $\Psi$  bringt die virale RNA in das Hüllprotein. Die lentiviralen Vektoren wurden mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert (Burns et al., 1993; Naldini et al., 1996), so dass die Viren Zellen unterschiedlicher Spezies infizieren können.

Für die Herstellung der rekombinanten Lentiviren wurden generell drei Plasmide benötigt: Das **Verpackungsplasmid** kodiert für die Strukturgene *gag*, *pol* und *rev* unter der Kontrolle des starken Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV). Das Verpackungsplasmid enthält zusätzlich ein Polyadenylierungssignal. Das **VSV-G Expressionsplasmid** kodiert für das Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) unter der Kontrolle des starken CMV-Promotor/Enhancer. Das **Transferplasmid**, auch selbst inaktivierender Transfervektor genannt, kodiert für das gewünschte Transgen unter der Kontrolle des internen Promotors, hier unter der Kontrolle des humanen Ubiquitinpromotors (Lois et al., 2002). Das Transferplasmid enthält das Verpackungssignal  $\Psi$ . Das Transferplasmid besitzt als weitere Elemente das "woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element" (WPRE) (Zufferey et al., 1998), um die Stabilität des viralen Transkripts zu erhöhen, indem es den Transport der Provirus-RNA in das Zytosol verstärkt, und das HIV-1-flap-Element (Sirven et al., 2000), um den Kerntransport der Virus-DNA zu erhöhen. Die Plasmide werden in einem ersten Schritt in die Verpackungszelllinie 293T kotransfiziert (s. 3.12.3). Erst 72 Stunden nach dieser Transfektion können die im Überstand enthaltenen Viruspartikel auf die zu infizierenden Zellen gegeben werden und der eigentliche Gentransfer stattfinden.

### 3.12.2 verwendete Plasmide

Zur Herstellung der rekombinanten Lentiviren wurden folgende lentivirale Transferplasmide verwendet:

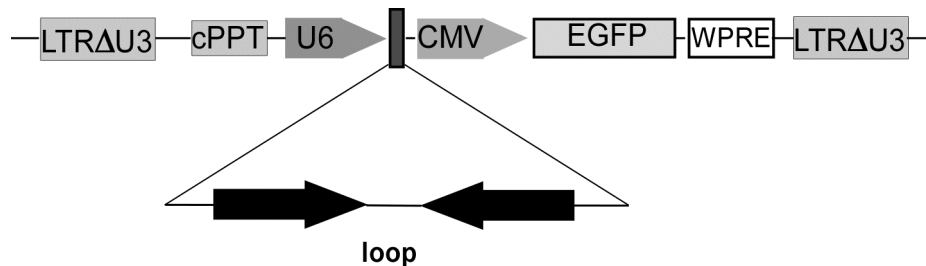
- pFWStRE-luc: enthält vor dem HO-1-Minimalpromotor drei Stress-Response-Elemente (StRE) aus dem murinen HO-1-Gen (Müller et al., 2009).
- pFUW: Grundgerüst für die lentiviralen Transfervektoren (Abbildung 2) (Lois et al., 2002).



**Abbildung 2: Der lentivirale Transfervektor pFUW** ist das Grundgerüst einiger verwendeter Transfervektoren. Als Promotor dient der humane UbiquitinC-Promotor (UbC). Neben dem Promotor sind weitere Elemente enthalten. Das nach dem Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV) und dem 5'long terminal repeat (LTR) enthaltene HIV-1-flap Element erhöht den Virustiter, das "woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element" (WPRE) die Transkriptionsrate. Die Sequenzen der jeweiligen Transgene wurden zwischen dem UbC-Promotor und dem WPRE inseriert.

- pFUW-Flag-p53DD: basiert auf dem pFUW-Plasmid und enthält die Sequenz von 340 bis 390 des humanen p53.
- pFUW-Flag-c-JunΔN: basiert auf dem pFUW-Plasmid und enthält die Sequenz von 188 bis 331 des humanen c-Jun (Mayer et al., 2008).
- pFUW-Flag-MEKK1Δ: basiert auf dem pFUW-Plasmid und kodiert für eine konstitutiv-aktive Mutante der MEKK1 (Spohn et al., 2010).
- pFUW-Flag-NLS-Nrf2: basiert auf dem pFUW-Plasmid und kodiert für kernlokalisiertes Nrf2.
- pFUW-HO-1: basiert auf dem pFUW-Plasmid und kodiert für die humane Hämoxygenase-1 (HO-1).

- pLentiLox3.7 (pLL3.7) (ATCC, Manassas, VA): Grundgerüst der lentiviralen Transfervektoren für die shRNAs (Rubinson et al., 2003). Der Provirus enthält zusätzlich unter der Kontrolle des Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV) eine kodierende Region für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Der lentivirale Transfervektor pLL3.7** ist das Grundgerüst der Transfervektoren für die spezifischen shRNAs. Unter dem Promotor/Enhancer des CMV kodiert der Vektor für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Neben dem Promotor sind weitere Elemente enthalten. Das “woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element” (WPRE) erhöht die Transkriptionsrate. Als Promotor für die shRNA dient der murine U6-Promotor. Die Sequenzen der jeweiligen shRNAs wurden zwischen dem U6- und dem CMV-Promotor inseriert.

- pLL3.7-p53: basiert auf dem pLL3.7-Plasmid und kodiert für eine shRNA gegen humanes p53. Die Sequenz stammt von Brummelkamp et al. (2002).
- pLL3.7-c-Jun: basiert auf dem pLL3.7-Plasmid und kodiert für eine shRNA gegen humanes c-Jun. Die Sequenz stammt von Freund et al. (2004).

Das Verpackungsplasmid, das VSV-G Expressionsplasmid und die aufgeführten Transferplasmide wurden von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

### 3.12.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Die humane embryonale Nierenzelllinie 293T/17 eignet sich für die Transfektion, da die Transfektionsrate hoch ist. Die Zellen dienen dabei als reine Verpackungszelllinie.

Zur Transfektion der Plasmide in die 293T/17-Zellen wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Außerdem wurde der DNA-Gehalt der Plasmide gemessen. Dazu wurde mit einem Photometer die optische Dichte (OD) einer 1:25 verdünnten Plasmidlösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient  $OD_{280nm}/OD_{260nm}$  gab die Reinheit der Plasmidlösung an. Eine sehr reine Lösung hatte dabei einen Wert zwischen 1,8 und 1,95. Aus der ermittelten DNA-Konzentration wurde das benötigte Volumen errechnet. Für das Verpackungsplasmid wurden 5,0 µg/60 mm Schale gebraucht, für das Hüllprotein-enthaltene Plasmid 2,3 µg/60 mm Schale. Für die Transferplasmide wurden je 6,6 µg/60 mm Schale verwendet.

Am Tag der Infektion wurde eine 2XHBSS-Lösung hergestellt und sterilfiltriert. Der pH-Wert der Lösung sollte zwischen 7,05 und 7,12 liegen. Erst dann hatte die Lösung die richtige Salzkonzentration.

Für die Herstellung der Transfektionslösung wurde in ein Polystearolröhrchen die HBSS-Lösung pipettiert, in ein anderes Röhrchen die berechneten Volumina an Expressionsplasmid, Verpackungsplasmid und Transferplasmid. Zusätzlich wurde zu der DNA-Lösung Wasser (Millipore) zugefügt. Den Ansätzen wurden dann pro Platte 27,5 µl einer 2,5 M  $CaCl_2$ -Lösung zugegeben. Danach wurde den ausgesäten 293T/17 Zellen das Medium abgesaugt und durch DMEM mit 25 µM Chloroquin ersetzt. Schließlich wurden die Ansätze mit ihrer jeweiligen HBSS-Lösung vermischt, indem die DNA- $CaCl_2$ -Lösung mit einer Einmal-Glaspipette langsam in die durch Ausblasen mit einer zweiten Einmal-Glaspipette aufgewirbelten HBSS-Lösung pipettiert wurde. Die Lösung wurde noch einmal durch Ausblasen aufgewirbelt. Nach dem Mischen wurde das sich bildende Präzipitat durch eine Trübung der Lösung sichtbar.

Die fertige Lösung wurde dann auf die Schalen gegeben (520 µl/ Schale) und durch leichtes Schwenken verteilt. Die Schalen wurden für 6-8 h im Brutschrank bei 5%  $CO_2$  und 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, zweimal mit 1XPBS gewaschen und dann frisches Medium zugegeben. Die Arbeitsschritte nach der Inkubation erfolgten unter S2-Bedingungen.

### **Chloroquin-Lösung:**

Eine 10 mM Stocklösung wurde mit Wasser (Millipore) angesetzt und danach sterilfiltriert. Die Endkonzentration im DMEM betrug 25 µM.

### **3.12.4 Lentivirale Infektion**

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter S2-Bedingungen.

48 h nach der Transfektion wurden die im Medium befindlichen rekombinanten, pseudotypisierten Viren mit einer Glaspipette abgenommen und mit einem Spritzenfilter (0,45 µm) sterilfiltriert. Dieser Schritt war notwendig, um die im Medium vorhandenen 293T/17 Zellen zu entfernen. Danach wurde der Virusstock je nach Versuch verdünnt. Der Virusstock wurde mit 1 µg/ml einer frischen Polybrene-Lösung versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gegeben. 8-10 h nach der Infektion wurde das Medium gewechselt.

### **Polybrene-Lösung:**

8 mg Polybren wurden in 1 ml Wasser (Millipore) gelöst und sterilfiltriert. Die Endkonzentration im Medium betrug 8 µg/ml.

### **3.12.5 Repotergenanalysen**

Das nach der Infektion in das Zellgenom integrierte Luziferasegen steht unter der Kontrolle des vorgeschalteten internen Promotors. Wird dieser Promotor aktiviert, wird die Luziferase vermehrt exprimiert. Die vermehrte Expression führt zu einer gesteigerten Aktivität der Luziferase. In einem Luziferase-Assay wird die Luziferase-Aktivität über die Umsetzung des Substrates Luziferin gemessen. Das bei der Umsetzung emittierte Licht wird dabei mit einem Luminometer gemessen.

Die Zellen wurden mit kaltem 1xPBS geerntet und anschließend lysiert. Dazu wurden die Zellpellets in 30-50 µl Lysepuffer resuspendiert und nach einer Inkubation von 5 min auf Eis 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden je 10 µl Zellextrakt auf eine 96-Loch-Platte pipettiert und mit je 100 µl Working Luciferase Assay Reagent (WLAR) versetzt. Die Messung der Lichtabgabe erfolgte unmittelbar im Luminometer. Die

gemessenen Lichteinheiten (LU) wurden mit der eingesetzten Proteinmenge abgeglichen, um die relative Luziferase-Aktivität zu bestimmen. Für die Bestimmung der eingesetzten Proteinmenge wurde eine Proteinbestimmung nach 3.10.4 mit 10 µl Zellextrakt durchgeführt. Mit der sich ergebenden Proteinkonzentration konnte die relative Luziferase-Aktivität berechnet werden.

Die Messung erfolgte in Vierfachansätzen. Aus den vier Einzelergebnissen wurden der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung gebildet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Balkendiagramm.

#### Lysepuffer

Die 5fache Stocklösung Reporter Lysis Buffer wurde mit Wasser 1:5 verdünnt. Die Lösung wurde jeweils frisch vor der Lyse angesetzt.

#### Working Luciferase Assay Reagent (WLAR)

9 Vol. Luciferase Assay Reagent Stock (LARS)

1 Vol. Luziferin (4,7 mM Luziferin wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert)

Die Lösung konnte für kurze Zeit bei -20°C aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wurde die Lösung ebenfalls lichtgeschützt und bei Raumtemperatur äquilibriert.

#### Luciferase Assay Reagent Stock (LARS)

22 mM	Tricine, pH 7,8
1,177 mM	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
2,94 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,11 mM	EDTA
36,3 mM	DTT
297 µM	Coenzym A
583 µM	ATP

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.



### 3.13 TUNEL-Assay

Zur Bestimmung der Apoptoserate mit dem TUNEL-Assay wurde das *InSitu* Cell Death Detection Kit, TMR red von Roche (# 12 156 792 910) verwendet. Damit kann in apoptotischen Zellen die Fragmentierung der DNA, also die Bildung von DNA-Strangbrüchen, nachgewiesen werden. Die Bezeichnung TUNEL steht für „terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“ und gibt an, dass beim TUNEL-Assay die Strangbrüche durch die Terminale Desoxynucleotidyltransferase mit rot fluoreszierenden Nukleotiden gekoppelt werden. Die Strangbrüche sind dann im Fluoreszenzmikroskop durch rote Färbungen in den Zellen zu erkennen.

Die Zellen wurden auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und stimuliert. Nach der Stimulation wurde vorsichtig das Medium mit einer Multikanalpipette abgenommen und der Zellrasen wurde für 20 Minuten trocknen gelassen. Die Zellen wurden mit 100 µl einer 4% Paraformaldehydlösung (v/v) in 1xPBS für eine Stunde bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit 1xPBS gewaschen. (Falls die Markierung mit dem TUNEL-Reagenz nicht direkt im Anschluss erfolgen sollte, wurden die Zellen in 1xPBS (aus dem zweiten Waschgang) mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bis zur Markierung aufbewahrt.) Je 100 µl der eiskalten Permeabilisierungslösung wurden vorsichtig mit der Multikanalpipette auf die Zellen gegeben und für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden je 40 µl des Reaktionsmix (bestehend aus 9 Vol Nukleotidmixture und 1 Vol Terminaler Transferase, je nach Bedarf frisch angesetzt) auf die Zellen gegeben. Dabei wurden die zellfreien Löcher der 96-Loch-Platte mit Wasser (Millipore) aufgefüllt, um eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre zu haben und so das Abdampfen des Reaktionsmix zu verhindern. Die Platte wurde dann 1 bis 3 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl 1xPBS gewaschen und mit der Hoechst-Färbelösung für 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen in Mounting-Medium und mit Parafilm abgedichtet bei 4 °C stehen gelassen. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Kamera und Software. Die Bilder wurden aufgenommen und das Verhältnis von TUNEL-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt.

#### Permeabilisierungslösung:

0,1% Triton X-100 (v/v)

1% Na-Citrat

#### Hoechst-Färbelösung:

Eine Stocklösung von 1 mg/ml in 1xPBS wurde angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration in der Färbelösung betrug 1 µg/ ml in 1xPBS. Die Färbelösung wurde frisch angesetzt.

#### Mounting-Medium:

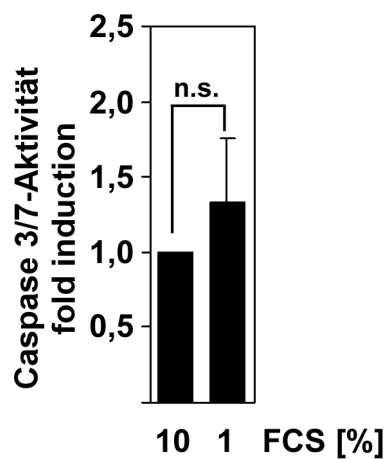
5% Polyvinylalkohol

10% Glycerin

Das Mounting Medium wurde in 1xPBS angesetzt und musste autoklaviert werden, um es zu lösen. Die fertige Lösung wurde dann bei -20 °C aufbewahrt und vor dem Gebrauch in der Mikrowelle erhitzt bis es wieder vollständig gelöst war.

## 4 Ergebnisse

Zuerst wurden die SH-SY5Y-Zellen ausgesät und für 24 h in DMEM mit 1% FCS kultiviert. Die Umsetzung eines spezifischen Substrates der Caspasen 3 und 7, dem CaspaseGlo-Substrat, setzte eine lichtemittierende Substanz frei und konnte demnach als Nachweis der Caspase 3/7 Aktivität dienen. Es zeigte sich, dass allein die Reduktion des Serumgehaltes von 10 auf 1% keinen Einfluss auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 hatte (Abbildung 4).



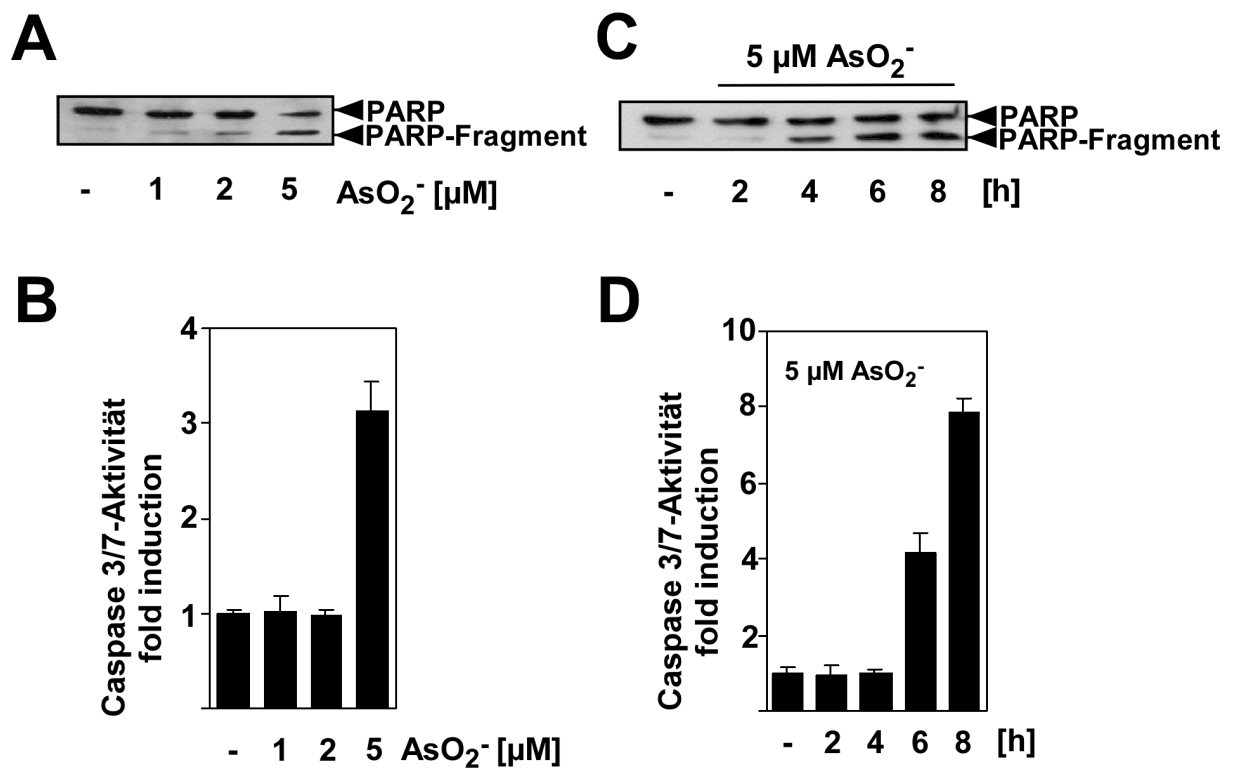
**Abbildung 4: Einfluss der Serumkonzentration auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in SH-SY5Y-Zellen**

SH-SY5Y-Zellen wurden für zwei Tage in DMEM mit entweder 10 oder 1% FCS kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

Deshalb wurden die Zellen in den weiteren Versuchen 24 h vor der Stimulation mit Arsenit der Serumgehalt von 10 auf 1% reduziert.

#### **4.1 Arsenit erhöht die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in SH-SY5Y Neuroblastomzellen**

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Arsenit für acht Stunden inkubiert. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde über die proteolytische Spaltung eines DNA Reparatur-Enzyms, der Poly(ADP) Ribosepolymerase (PARP), nachgewiesen. Bei der Proteolyse wird das 113 kDa große Protein in zwei Spaltprodukte von der Größe 89 kDa und 24 kDa gespalten. Im Western Blot konnten nun beide Fragmente nachgewiesen werden. Dabei weist die Spaltung von PARP auf eine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und Apoptose hin. Neben dem Nachweis der Aktivierung der Caspasen 3 und 7 im Western Blot wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo Substrat direkt gemessen. Dabei zeigte sich, dass eine Stimulation der Zellen mit 5  $\mu$ M Arsenit für 8 Stunden zu einer Spaltung von PARP und einer Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität führte (Abbildung 5 A, B). Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch 5  $\mu$ M Arsenit erfolgte nach 4 bis 6 Stunden. Nach 8 Stunden war die Aktivierung am höchsten (Abbildung 5 C, D). Demnach wurde in nachfolgenden Experimenten eine Arsenitkonzentration von 5  $\mu$ M und eine Stimulationszeit von 8 Stunden gewählt.

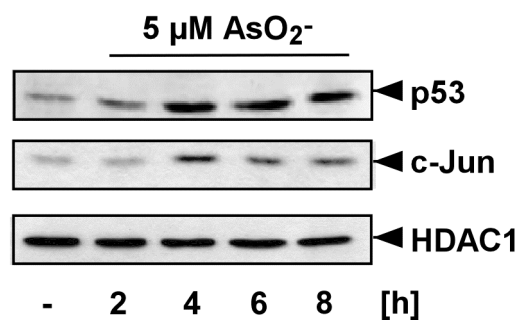


**Abbildung 5: Arsenit aktiviert die Caspasen 3 und 7 in SH-SY5Y-Zellen.**

(A, B) SH-SY5Y-Zellen wurden für 8 Stunden mit Arsenit stimuliert (1, 2, 5  $\mu\text{M}$ ). (C, D) Die Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  Arsenit stimuliert und nach Zeitreihe geerntet. (A, C) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot analysiert. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der gegen das Volllängenprotein (113 kDa) und das Hauptspaltprodukt (89 kDa) von PARP gerichtet ist. (B, D) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen.

## 4.2 Arsenit erhöht die Expression von c-Jun und p53 in SH-SY5Y-Zellen

Arsenit setzt eine Signalkaskade in der Zelle in Gang, die die Aktivierung von Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren umfasst (Namgung und Xia, 2000; Yih und Lee, 2000; Jiang et al., 2001). In SH-SY5Y-Zellen konnte eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun nachgewiesen werden (Abbildung 6).



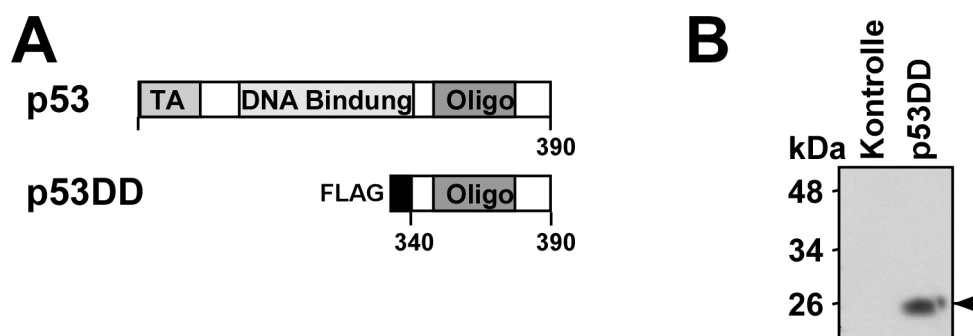
**Abbildung 6: Verstärkte Expression von p53 und c-Jun in Arsenit-stimulierten SH-SY5Y-Zellen.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 5 μM Arsenit für 2-8 Stunden stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit Antikörpern gegen p53 und c-Jun analysiert. HDAC1 diente als Ladekontrolle.

### 4.3 Die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen und der induzierte Zelltod sind abhängig von p53

#### 4.3.1 Die Expression einer verkürzten Mutante von p53 reduziert die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Arsenit-stimulierten Neuroblastomzellen und schützt vor Apoptose

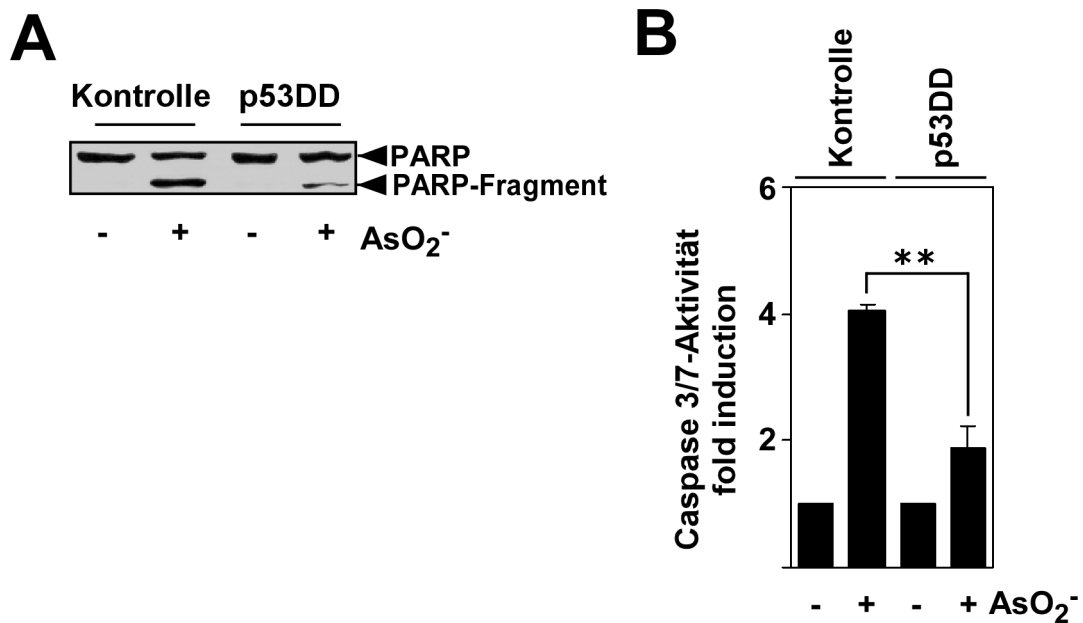
Arsenit erhöhte die Expression der Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun (Abbildung 6). Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von p53 und der Arsenit-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in den SH-SY5Y-Zellen zu untersuchen, wurde die verkürzte Mutante von p53, p53DD, mittels lentiviralem Gentransfer in den Zellen exprimiert (Abbildung 7 A). Diese Mutante von p53 besitzt zwar den C-Terminus mit der Oligomerisierungsdomäne von p53, ihr fehlen aber die Domänen für die Transaktivierung und die DNA-Bindung (Gottlieb et al., 1994). Somit verhindert die Mutante die korrekte Oligomerisierung der p53-Monomere. Zum immunologischen Nachweis besitzt p53DD ein FLAG-Epitop. Somit konnte die Expression von p53DD nach der Infektion mit dem p53DD-kodierenden Lentivirus nachgewiesen werden (Abbildung 7 B).



**Abbildung 7: Die verkürzte Mutante p53DD**

(A) Schematische Darstellung des endogenen p53 und der verkürzten Mutante p53DD. Die Mutante p53DD besitzt nur die Oligomerisierungsdomäne und ein FLAG-Epitop. (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für p53DD kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Ganzzelextrakte wurden präpariert und das Transgen mit einem spezifischen Antikörper gegen das FLAG-Epitop im Western Blot nachgewiesen.

Nachdem die korrekte Expression der Mutante überprüft war, konnte ihre Funktionalität untersucht werden. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen, die p53DD exprimierten, mit Arsenit stimuliert. Abbildung 8 A und B zeigt, dass die Expression von p53DD zu einer verringerten Arsenit-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 führte.

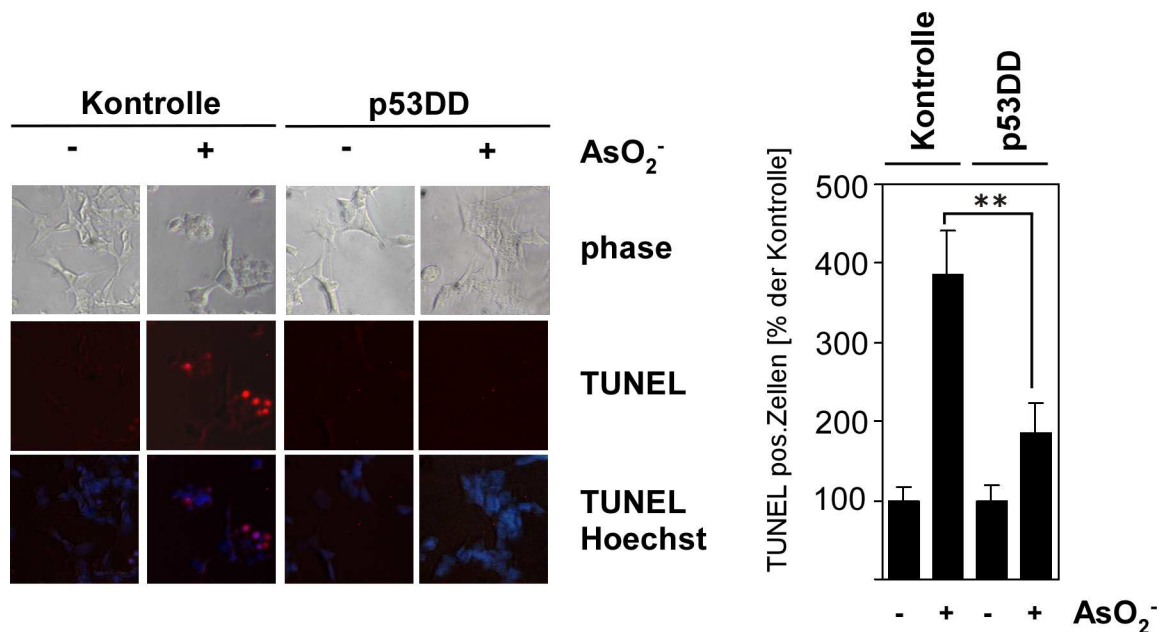


**Abbildung 8: Die Expression von p53DD in SH-SY5Y-Zellen verringert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit.**

p53DD-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. (A) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen PARP analysiert. (B) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,01$ ).



Ein TUNEL-Assay zeigte, dass die Expression der p53-Mutante p53DD SH-SY5Y-Zellen vor dem Arsenit-induzierten Zelltod schützen konnte (Abbildung 9).

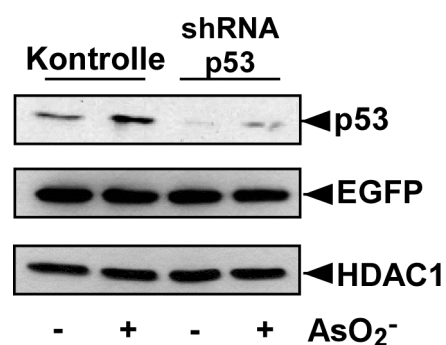


**Abbildung 9: Die Expression von p53DD in SH-SY5Y-Zellen schützt die Zellen vor Apoptose durch Arsenit.**

p53DD-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,01$ ).

### 4.3.2 Die Expression einer p53-spezifischen shRNA reduziert die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen und schützt vor Apoptose

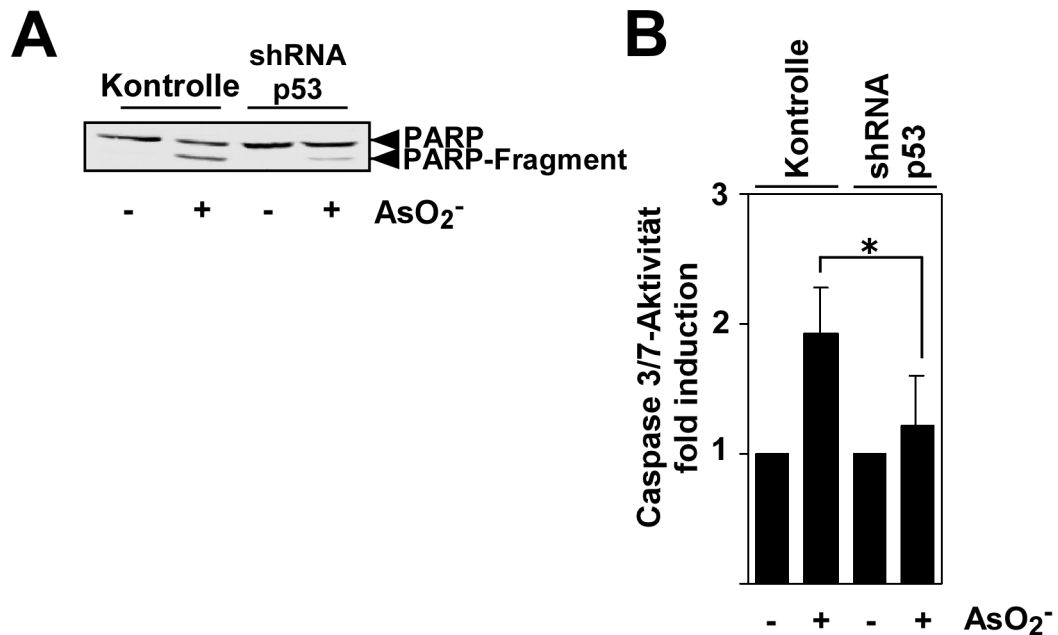
Um die p53-Abhängigkeit der Arsenit-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in SH-SY5Y-Zellen zu bestätigen, wurde in den Zellen eine p53-spezifische shRNA durch lentiviralen Gentransfer exprimiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem Plasmid pLL3.7 generiert worden waren. Da beide Proviren in einer weiteren Transkriptionseinheit für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) kodierten, konnte der Nachweis der Expression von EGFP mit einem EGFP-spezifischen Antikörper im Western Blot als Kontrolle der Infektion dienen. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Arsenit stimuliert. Im Western Blot wurde die erfolgreiche Unterdrückung der p53-Expression nachgewiesen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Expression einer p53-spezifischen shRNA in SH-SY5Y-Zellen**

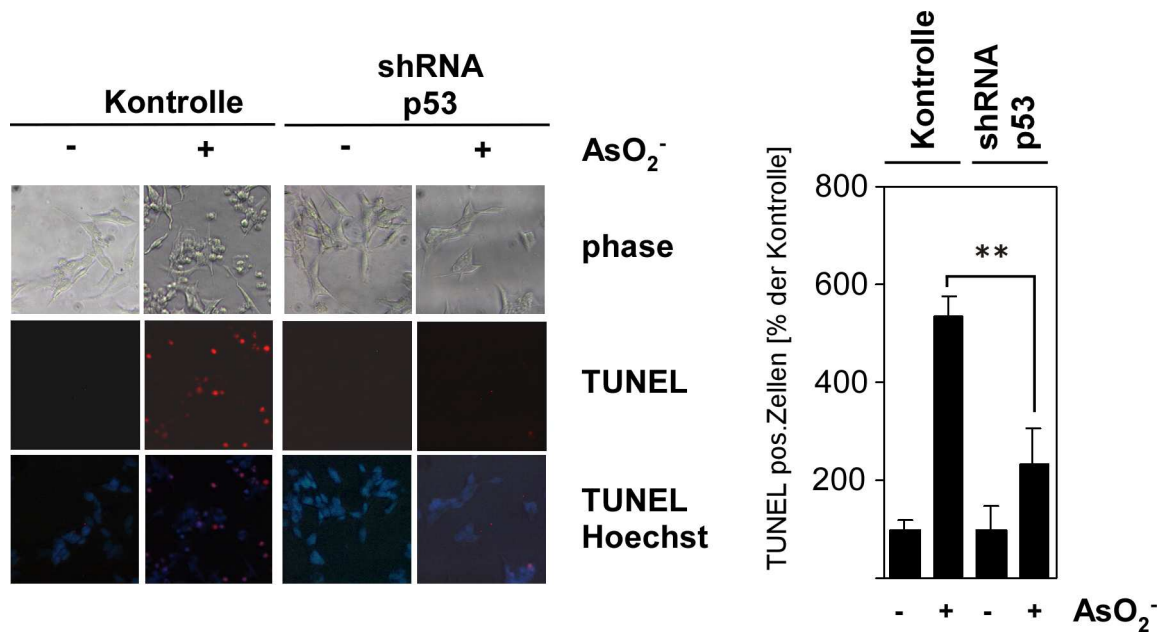
SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für eine p53-spezifische shRNA kodierten. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pLL3.7-Plasmid generiert worden waren. Nach der Stimulation wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte (für EGFP) präpariert und im Western Blot analysiert. Dazu wurden Antikörper gegen p53, EGFP und als Ladekontrolle gegen HDAC1 benutzt.

Die Expression einer p53-spezifischen shRNA reduzierte die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Arsenit-stimulierten Neuroblastomzellen (Abbildung 11 A und B). Die TUNEL-Analyse zeigte, dass die Zellen dabei vor dem programmierten Zelltod geschützt waren (Abbildung 12).



**Abbildung 11:** Die Expression einer p53-spezifischen shRNA verringert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit in SH-SY5Y-Zellen.

p53-shRNA-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. (A) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen PARP analysiert. (B) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*, signifikant,  $P < 0,05$ ).



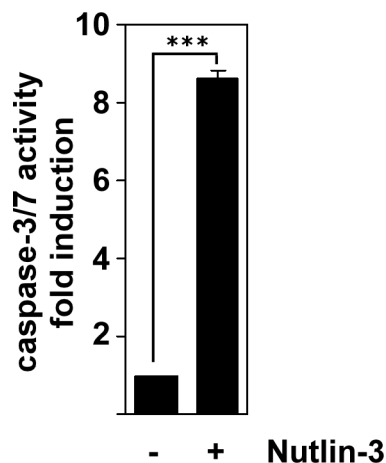
**Abbildung 12: Die Expression einer p53-spezifischen shRNA schützt SH-SY5Y-Zellen vor dem Arsenit-induzierten Zelltod.**

p53-shRNA-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,01$ ).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die vermehrte Expression von p53 essentiell für Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und den zytotoxischen Effekten in Arsenit-stimulierten SH-SY5Y-Zellen ist.

#### 4.4 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen durch Nutlin-3 ist abhängig von p53

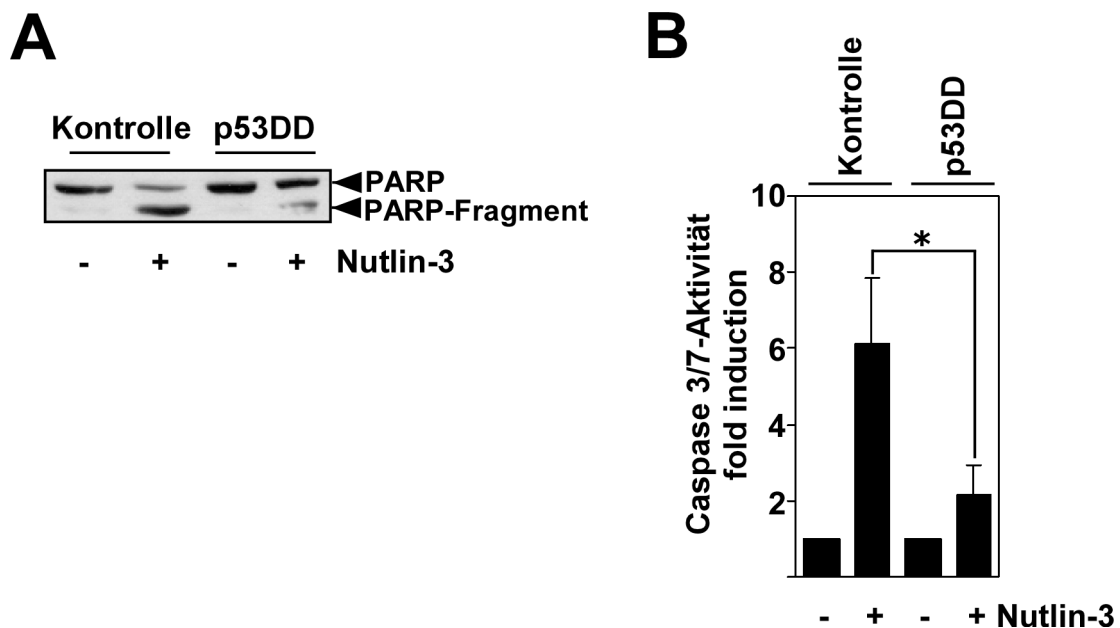
Ein weiteres Beispiel sollte die bisherigen Ergebnisse, dass der p53-abhängige und durch die Caspasen 3 und 7 vermittelte Zelltod durch die Expression der p53-Mutante p53DD bzw. einer p53-spezifischen shRNA verhindert werden kann, bestätigen. Dafür wurden die Untersuchungen mit Nutlin-3 wiederholt. Nutlin-3 bindet an die E3 Ubiquitinligase des MDM2-Rezeptors und stört die Interaktion zwischen p53 und MDM2. Dadurch kommt es zu einem Abbau von p53 (Vassilev et al., 2004). Nutlin-3 aktivierte in SH-SY5Y Zellen die Caspasen 3 und 7 (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Nutlin-3 aktiviert die Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen.**

SH-SY5Y-Zellen wurden für 8 Stunden mit 10  $\mu$ M Nutlin-3 stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*\*\*, höchst signifikant,  $P < 0,001$ ).

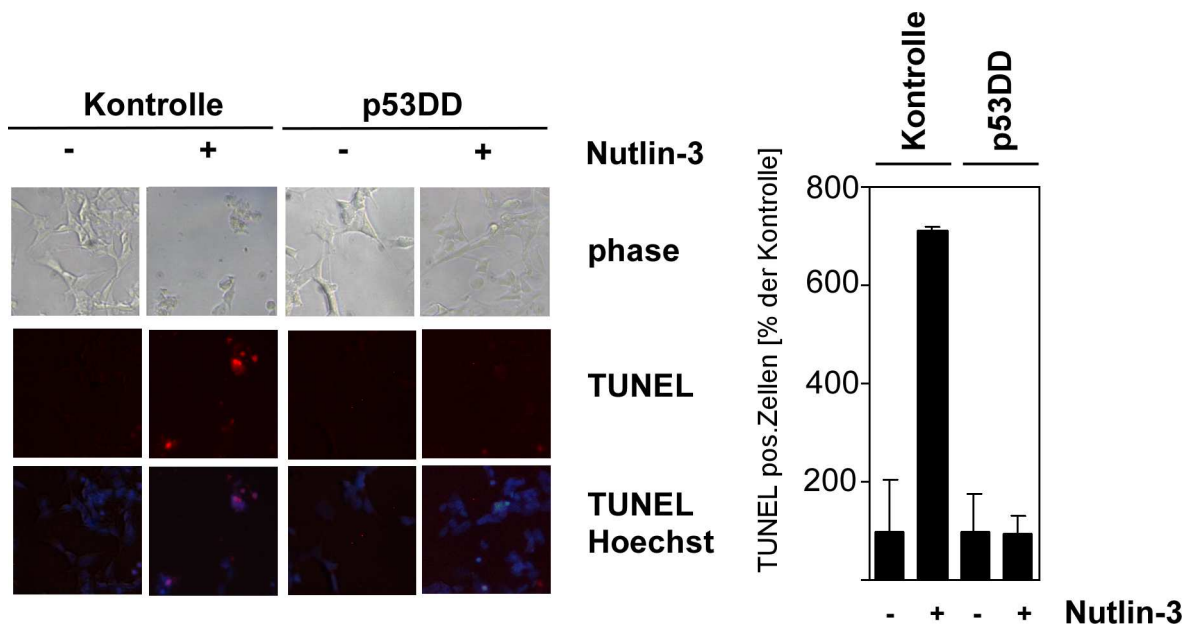
Die Zellen wurden mit Lentiviren, die für die p53-Mutante p53DD kodierten, infiziert und mit Nutlin-3 stimuliert. Abbildung 14 zeigt, dass die Expression von p53DD die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Nutlin-3 verhinderte.



**Abbildung 14: Die Expression von p53DD in SH-SY5Y-Zellen verringert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Nutlin-3.**

p53DD-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Nutlin-3 stimuliert. (A) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen PARP analysiert. (B) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*, signifikant,  $P < 0,05$ ).

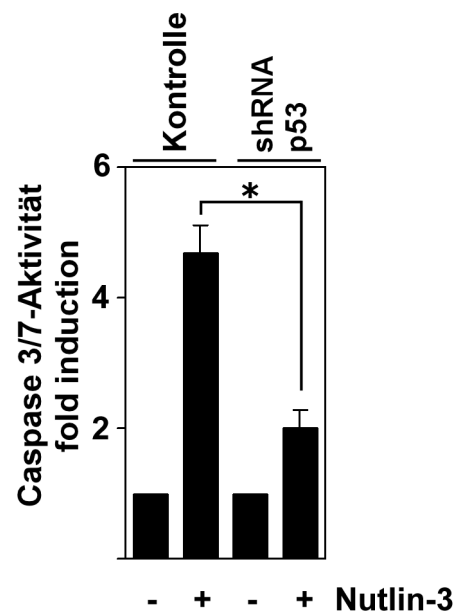
Eine TUNEL-Analyse zeigte, dass die Zellen durch die Expression von p53DD vor dem Nutlin-3-induzierten Zelltod geschützt waren (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Die Expression von p53DD in SH-SY5Y-Zellen schützt die Zellen vor Apoptose durch Nutlin-3.**

p53DD-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Nutlin-3 stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop gezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt.

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurden die Zellen mit Lentiviren, die für eine p53-spezifische shRNA kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem Plasmid pLL3.7 generiert worden waren. Die Zellen wurden mit Nutlin-3 stimuliert. Messungen der Caspase 3/7-Aktivität zeigten, dass diese in den shRNA-exprimierenden Zellen durch Nutlin-3 nicht erhöht war (Abbildung 16).

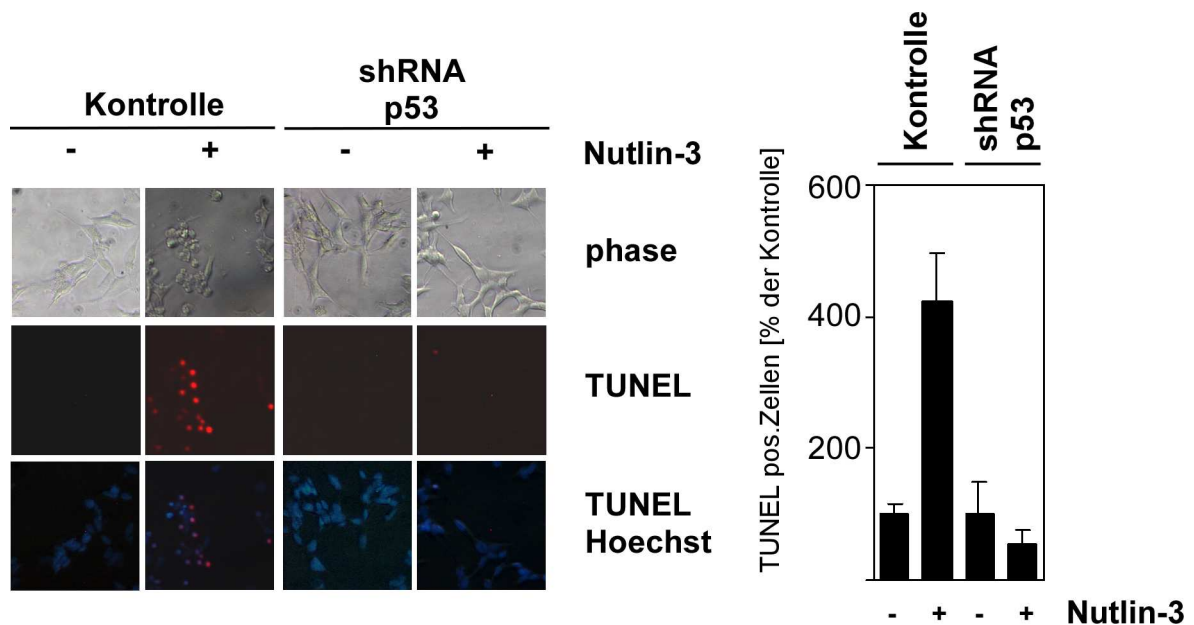


**Abbildung 16:** Die Expression einer p53-spezifischen shRNA verringert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Nutlin-3 in SH-SY5Y-Zellen.

p53-shRNA-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Nutlin-3 stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*, signifikant,  $P < 0,05$ ).



Eine TUNEL-Analyse zeigte, dass durch die Expression einer p53-spezifischen shRNA die SH-SY5Y-Zellen vor programmierten Zelltod geschützt waren (Abbildung 17).

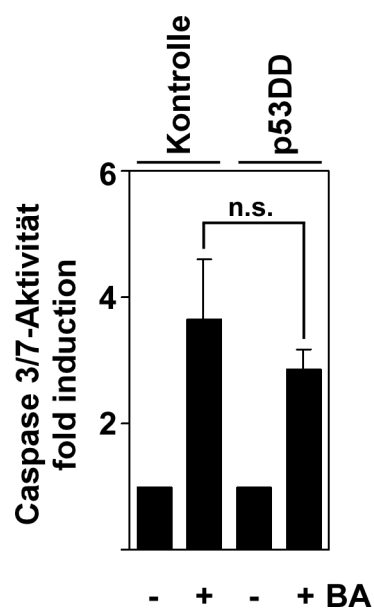


**Abbildung 17: Die Expression einer p53-spezifischen shRNA schützt SH-SY5Y-Zellen vor dem Nutlin-3-induzierten Zelltod.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für eine p53-spezifische shRNA kodierten. Zusammen mit Kontrollzellen wurden die Zellen mit Nutlin-3 stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt.

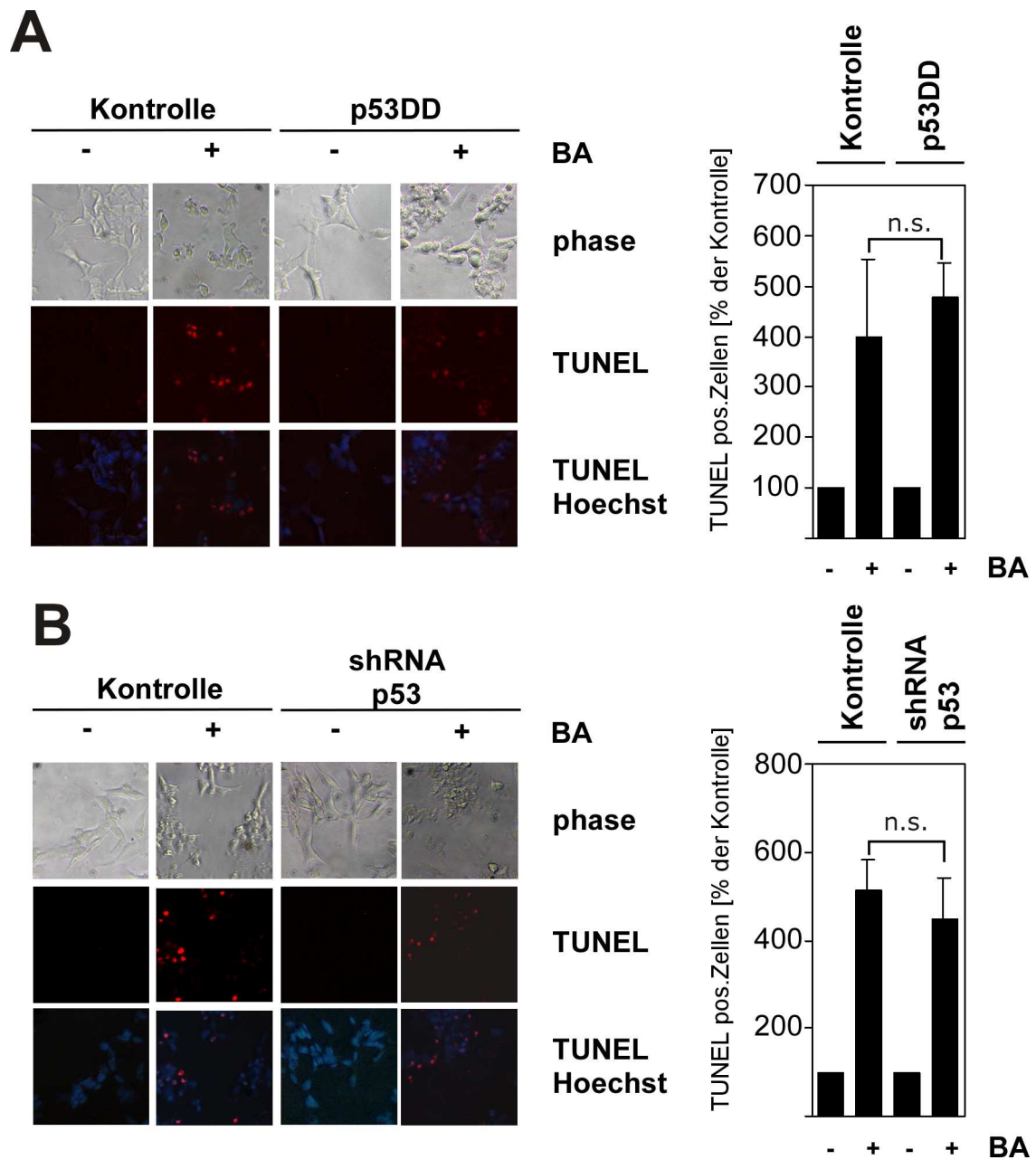
#### 4.5 Betulinsäure führt in Neuroblastomzellen unabhängig von p53 zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7

Als Beispiel, dass die Expression der p53-Mutante bzw. einer p53-spezifischen shRNA nicht vor p53-unabhängigen Zelltod schützt, wurden die Neuroblastomzellen mit Betulinsäure stimuliert. Betulinsäure (BA) induziert unabhängig von p53 die Apoptose (Fulda und Debatin, 2000). Abbildung 18 zeigt, dass die Expression der p53-Mutante p53DD nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Betulinsäure verhindern konnte. Auch der durch Betulinsäure induzierte Zelltod kann weder durch Expression der p53-Mutante p53DD noch durch die verhinderte Expression von p53 verhindert werden (Abbildung 19 A und B).



**Abbildung 18: Die Expression von p53DD in SH-SY5Y-Zellen verringert nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Betulinsäure.**

p53DD-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden für 24 h Stunden mit 10 µg/ml Betulinsäure (BA) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

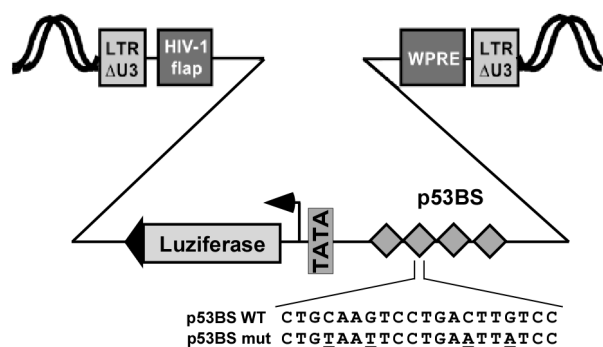


**Abbildung 19: Die verhinderte Expression von p53 schützt SH-SY5Y Zellen nicht vor Apoptose durch Betulinsäure.**

(A) p53DD-exprimierende bzw. (B) p53-shRNA-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Betulinsäure stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

#### 4.6 p53 ist in Arsenit- und Nutlin-3-stimulierten Neuroblastomzellen transkriptionell aktiv

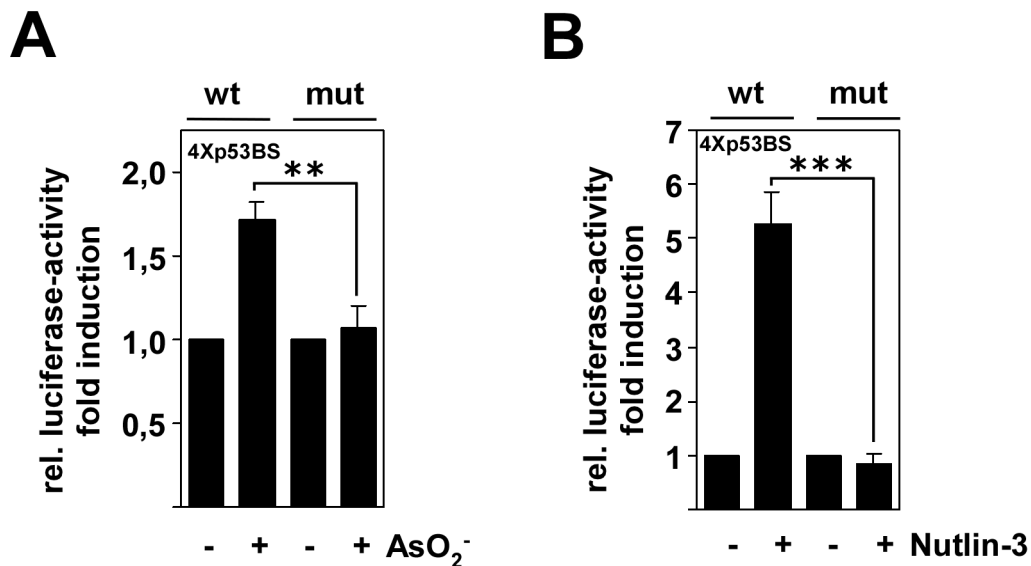
Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert die Transaktivierung der p53-responsiven Gene. Es gibt Daten, dass p53 nicht nur transkriptionell als Transkriptionsfaktor wirkt, sondern dass durch eine Translokation des p53 das Transkriptionsmuster verändert wird (Vaseva und Moll, 2009). Um zu untersuchen, ob die durch Arsenit bzw. Nutlin-3 erhöhte Expression von p53 zu einer gesteigerten transkriptionellen Funktion von p53 führt, wurden SH-SY5Y-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ein p53-responsives Reportergen kodierten. Dieses Reportergen enthielt vier p53-responsive Elemente (BS2) aus dem humanen PUMA-Promotor. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ein Reportergen kodieren, dessen p53-responsive Elemente Mutationen beinhalteten (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Modulare Struktur des integrierten Provirus, der für ein p53-responsives Reportergen kodiert.** Die Wildtyp bzw. mutierten p53-Bindestellen, p53BS, sind dargestellt.

Die Zellen wurden mit Arsenit oder Nutlin-3 stimuliert und eine Reportergenanalyse durchgeführt. Dabei führte die Stimulation mit Arsenit oder Nutlin-3 zu einer verstärkten Transkription des Reportergens und damit zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von p53. Die Mutationen in den p53-responsiven Elementen dagegen führten nicht zu einer

Transkription des Reportergens (Abbildung 21). Damit konnte gezeigt werden, dass p53 in Arsenit und Nutlin-3 stimulierten Neuroblastomzellen transkriptionell aktiv ist.



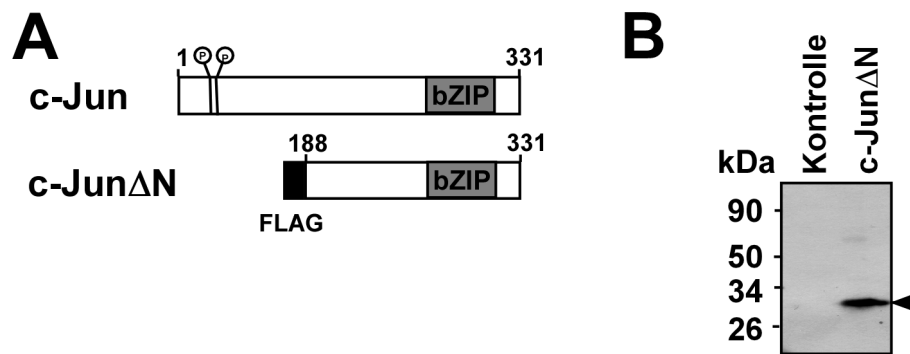
**Abbildung 21: p53 ist in Arsenit und Nutlin-3 stimulierten Neuroblastomzellen transkriptionell aktiv.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für ein p53-responsives Reportergen kodierte (WT), infiziert. Als Kontrolle wurden in den Zellen ein Reportergen exprimiert, das nicht mehr durch p53 reguliert werden konnte (mut). Die Zellen wurden mit (A) Arsenit oder (B) Nutlin-3 stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und eine Reportergenanalyse durchgeführt. Dabei wurde die gemessene Luziferaseaktivität an der Proteinkonzentration normalisiert (\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,01$ ; \*\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,001$ ).

## **4.7 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und die Induktion des programmierten Zelltods durch Arsenit wird in Neuroblastomzellen nicht durch c-Jun reguliert**

### **4.7.1 Die Expression der dominant-negativen Mutante von c-Jun reduziert weder die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 noch den induzierten Zelltod in Neuroblastomzellen**

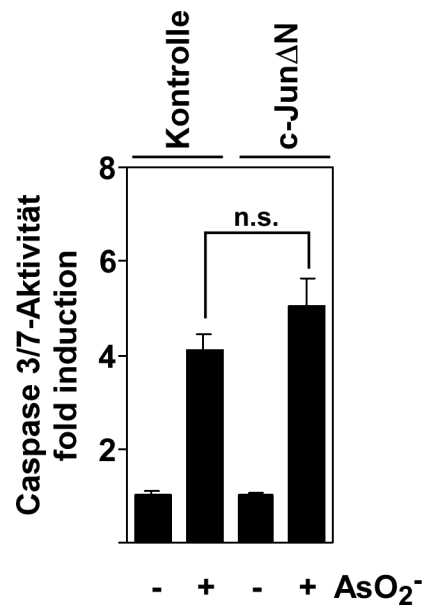
In Abbildung 6 habe ich gezeigt, dass die Arsenit-Stimulation zu einer erhöhten Expression von c-Jun führt. Um zu untersuchen, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von c-Jun und der erhöhten Aktivität der Caspasen 3 und 7 gibt, wurde die dominant-negative Mutante von c-Jun, c-Jun $\Delta$ N, mittels lentiviralem Gentransfer in den Zellen exprimiert (Abbildung 22 A). Die dominant-negative Mutante von c-Jun besteht nur aus den Aminosäuren 188 bis 331 des c-Jun-Proteins. Ihr fehlt gegenüber der Wildtypform von c-Jun die N-terminale Regulationsregion und die transkriptionale Aktivierungsdomäne. Dadurch bindet c-Jun $\Delta$ N zwar an seine Bindepartner, die anschließende DNA-Bindung kommt aber nicht zustande. Die dominant-negative Mutante ist biologisch aktiv (Steinmüller und Thiel, 2003). Zum immunologischen Nachweis besitzt c-Jun $\Delta$ N N-terminal ein FLAG-Epitop. Somit konnte die Expression der c-Jun Mutante nachgewiesen werden (Abbildung 22 B).



**Abbildung 22: Die dominant-negative Mutante c-JunΔN**

(A) Moduläre Struktur von c-Jun und der dominant-negativen Mutante c-JunΔN. c-JunΔN besitzt nur die bZIP-Domäne und ein FLAG-Epitop für den immunologischen Nachweis. (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für c-JunΔN kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Kernextrakte wurden präpariert und das Transgen mit einem spezifischen Antikörper gegen das FLAG-Epitop im Western Blot nachgewiesen.

Nachdem die korrekte Expression der Mutanten nachgewiesen worden war, konnte ihre Funktionalität untersucht werden. Dazu wurden c-JunΔN-exprimierende SH-SY5Y-Zellen und Kontrollzellen mit Arsenit stimuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-JunΔN zu keiner Veränderung der Arsenit-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 führte (Abbildung 23).

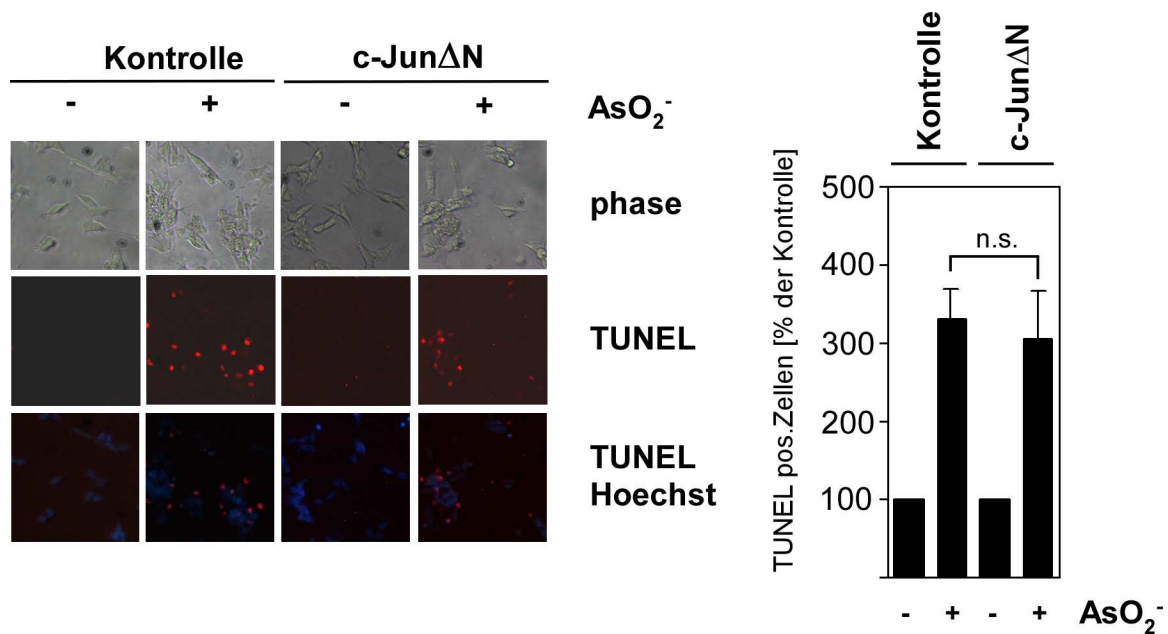


**Abbildung 23:** Die Expression von c-JunΔN in SH-SY5Y-Zellen verändert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit nicht.

c-JunΔN-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).



Ein TUNEL-Assay zeigte, dass die Expression von c-Jun $\Delta$ N die Zellen nicht vor dem Arsenit-induzierten Zelltod schützen konnte (Abbildung 24).

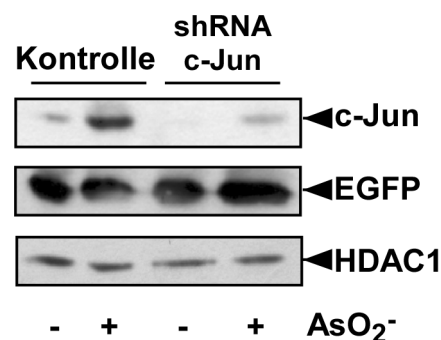


**Abbildung 24: Die Expression von c-Jun $\Delta$ N in SH-SY5Y-Zellen schützt die Zellen nicht vor Apoptose durch Arsenit.**

c-Jun $\Delta$ N-exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop gezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

#### 4.7.2 Die Expression einer c-Jun-spezifischen shRNA reduziert nicht die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen und schützt nicht vor Apoptose

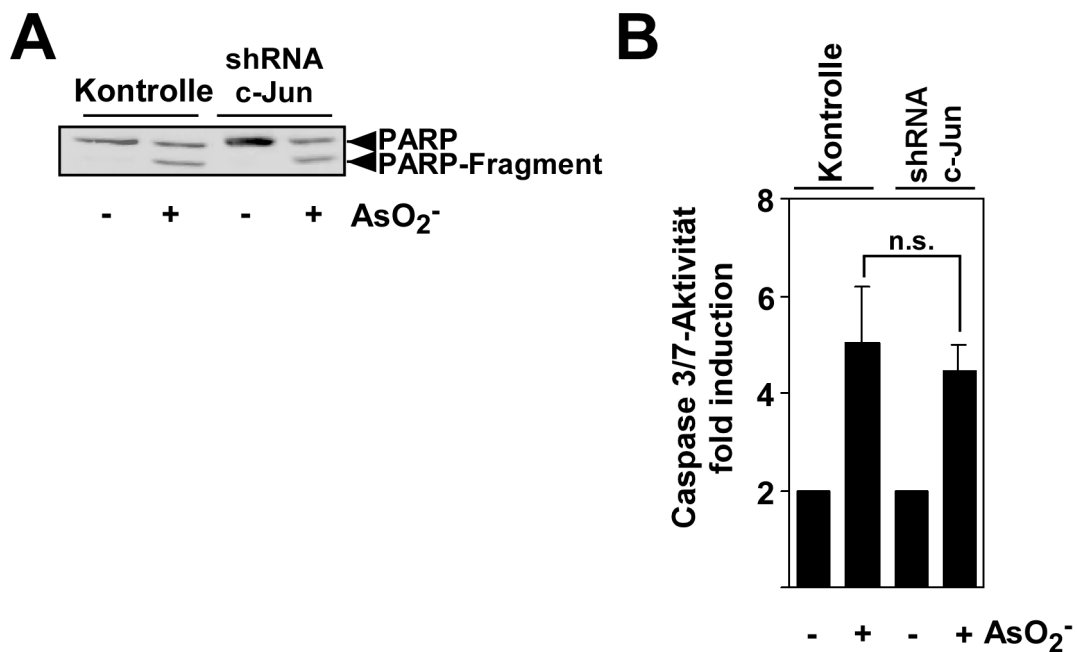
Um die Unabhängigkeit der Arsenit-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 von c-Jun in SH-SY5Y Zellen zu bestätigen, wurde in den Zellen eine c-Jun-spezifische shRNA durch lentiviralen Gentransfer exprimiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem Plasmid pLL3.7 generiert worden waren. Der Nachweis der Expression von EGFP mit einem EGFP-spezifischen Antikörper im Western Blot diente als Kontrolle der Infektion. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Arsenit stimuliert. Im Western Blot konnte die erfolgreiche Unterdrückung der c-Jun-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Die Expression einer c-Jun-spezifischen shRNA in SH-SY5Y-Zellen**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für eine c-Jun-spezifische shRNA kodierten. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren für pLL3.7 infiziert. Nach der Stimulation mit Arsenit wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte (für EGFP) präpariert und im Western Blot analysiert. Dazu wurden Antikörper gegen c-Jun, EGFP und als Ladekontrolle gegen HDAC1 benutzt.

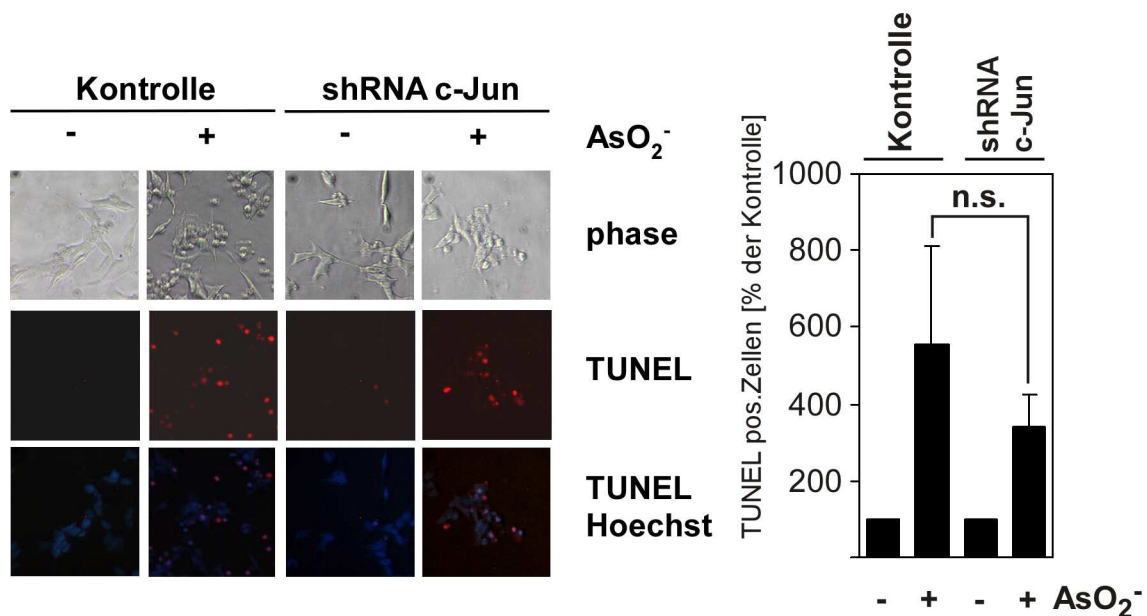
Die Unterdrückung der c-Jun-Expression durch eine spezifische shRNA reduzierte nicht die Arsenit-induzierte Proteolyse des Apoptosemarkers PARP (Abbildung 26 A) und nicht die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 (Abbildung 26 B) in SH-SY5Y-Zellen.



**Abbildung 26: Die Expression einer c-Jun-spezifischen shRNA verändert nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit in SH-SY5Y-Zellen.**

SH-SY5Y Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für eine c-Jun-spezifische shRNA kodierten. Als Kontrolle wurden Zellen Lentiviren für pLL3.7 infiziert. Die Zellen wurden mit Arsenit stimuliert. (A) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen PARP analysiert. (B) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s. nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

Ein TUNEL-Assay zeigt, dass die Expression der c-Jun-spezifischen shRNA die Neuroblastomzellen nicht vor dem Arsenit-induzierten Zelltod schützen konnte (Abbildung 27).



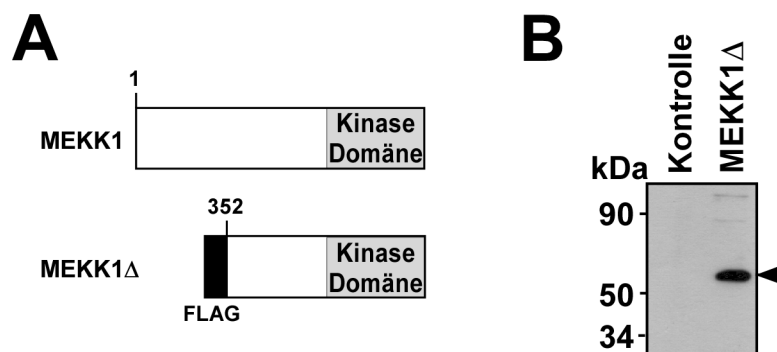
**Abbildung 27: Die Expression einer c-Jun-spezifischen shRNA schützt SH-SY5Y-Zellen nicht vor dem Arsenit-induzierten Zelltod.**

c-Jun-shRNA-exprimierende SH-SY5Y-Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit TUNEL-Reagenz und einer Kernfärbung nach Hoechst gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die vermehrte Expression von c-Jun für Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und den zytotoxischen Effekten in Arsenit-stimulierten SH-SY5Y-Zellen nicht essentiell ist.

## 4.8 Die konstitutiv-aktive Mutante von MEKK1 erhöht die Aktivität der Caspasen 3 und 7 über c-Jun

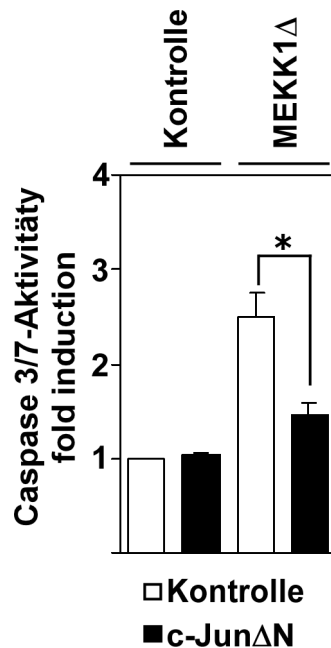
Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase-1 (MEKK1) reguliert u.a. den JNK (c-Jun N-terminale Kinase) Signalweg (Minden et al., 1994). Somit ist die Expression einer verkürzten konstitutiv-aktiven Mutante, MEKK1 $\Delta$ , durch lentiviralen Gentransfer in Neuroblastomzellen ein Beispiel für eine c-Jun-abhängige Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Die Mutante besitzt ein Flag-Epitop zum immunologischen Nachweis (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Die konstitutiv-aktive Mutante MEKK1 $\Delta$  in SH-SY5Y-Zellen**

(A) Der konstitutiv-aktiven Mutante von MEKK1 fehlen die Aminosäuren 1-352 der MEKK1 und besteht aus der Kinasedomäne und einem FLAG-Epitop zum immunologischen Nachweis. (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für MEKK1 $\Delta$  kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Serumreduktion geerntet und Kernextrakte präpariert. Im Western Blot wurde die Expression von MEKK1 $\Delta$  mit einem gegen das FLAG-Epitop spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Die Zellen wurden mit Lentiviren, die für die konstitutiv-aktive Mutante MEKK1 $\Delta$  kodierten, und mit Lentiviren, die für c-Jun $\Delta$ N kodierten, infiziert. Nach 48 h Serumreduktion wurden die Zellen geerntet und die Umsetzung des CaspaseGlo-Substrates als Nachweis der Caspase 3/7-Aktivität gemessen (Abbildung 29).



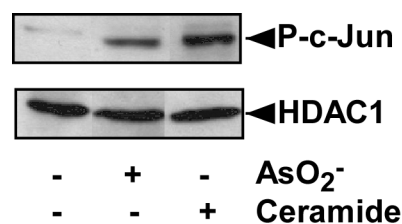
**Abbildung 29: Die Expression von MEKK1 $\Delta$  in SH-SY5Y-Zellen führt c-Jun-abhängig zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für MEKK1 $\Delta$  kodierten, und Lentiviren, die für c-Jun $\Delta$ N kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Serumreduktion geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (\*, signifikant,  $P < 0,05$ ).

## 4.9 Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit erfolgt in Neuroblastomzellen nicht über einen JNK-abhängigen Signalweg

### 4.9.1 Die Stimulation von Neuroblastomzellen mit Arsenit führt zur Phosphorylierung von c-Jun

Da Arsenit zu einer erhöhten Expression von c-Jun in Neuroblastomzellen führte (Abbildung 3), wurde untersucht, ob c-Jun aktiviert wurde. Die Aktivierung von c-Jun erfolgt über die Phosphorylierung durch die c-Jun N-terminalen Proteinkinase (JNK). Neuroblastomzellen wurden mit Arsenit stimuliert und die Kernextrakte im Western Blot auf eine Phosphorylierung von c-Jun analysiert. Abbildung 30 zeigt, dass eine Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Arsenit zu einer erhöhten Phosphorylierung von c-Jun führte. Als Kontrolle wurden parallel SH-SY5Y-Zellen für 24 Stunden mit 25  $\mu$ M C2-Ceramide stimuliert, einem bekannten JNK-Aktivator (Strle et al., 2006).

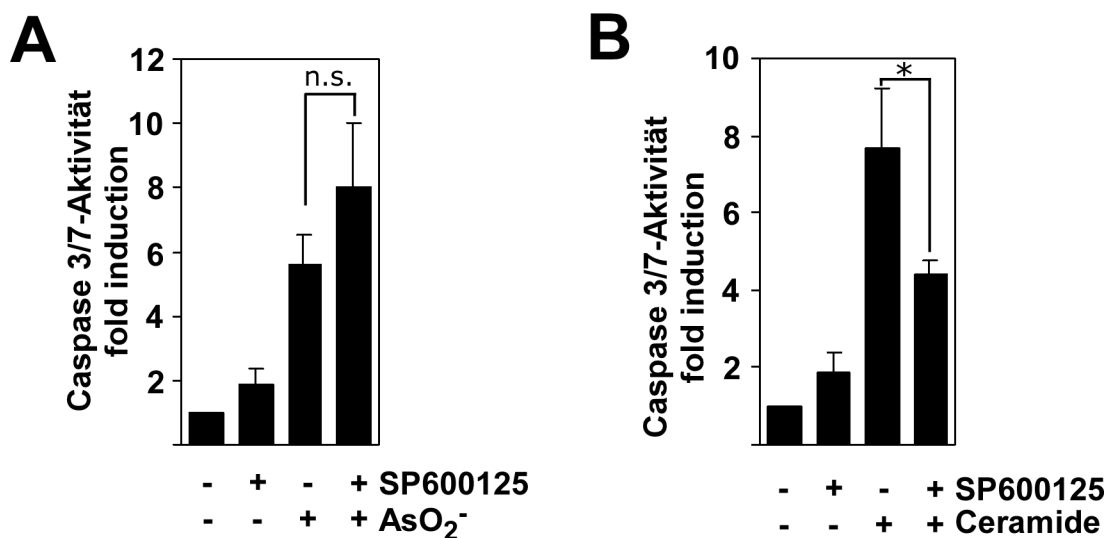


**Abbildung 30: Die Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Arsenit führt zur Phosphorylierung von c-Jun.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Arsenit stimuliert. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y-Zellen für 24 Stunden mit 25  $\mu$ M C2-Ceramide stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes c-Jun analysiert.

#### 4.9.2 Der Inhibitor der c-Jun N-terminalen Proteinkinase, SP600125, reduziert nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit

Da die Stimulation von Neuroblastomzellen mit Arsenit zu einer Phosphorylierung von c-Jun führte, wurde untersucht, ob die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 abhängig von JNK ist. Deshalb wurden Neuroblastomzellen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt und anschließend mit Arsenit stimuliert (Bennett et al., 2001). Als Kontrolle wurden parallel Neuroblastomzellen nach der Behandlung mit SP600125 mit C2-Ceramide stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Caspase-3/7 Aktivität gemessen. Dabei konnte die Behandlung mit dem JNK-Inhibitor die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit nicht reduzieren (Abbildung 31 A). In den Kontrollzellen konnte die C2-Ceramid-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 verringert werden (Abbildung 31 B).



**Abbildung 31: Der JNK-Inhibitor SP600125 reduziert in Neuroblastomzellen nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit.**

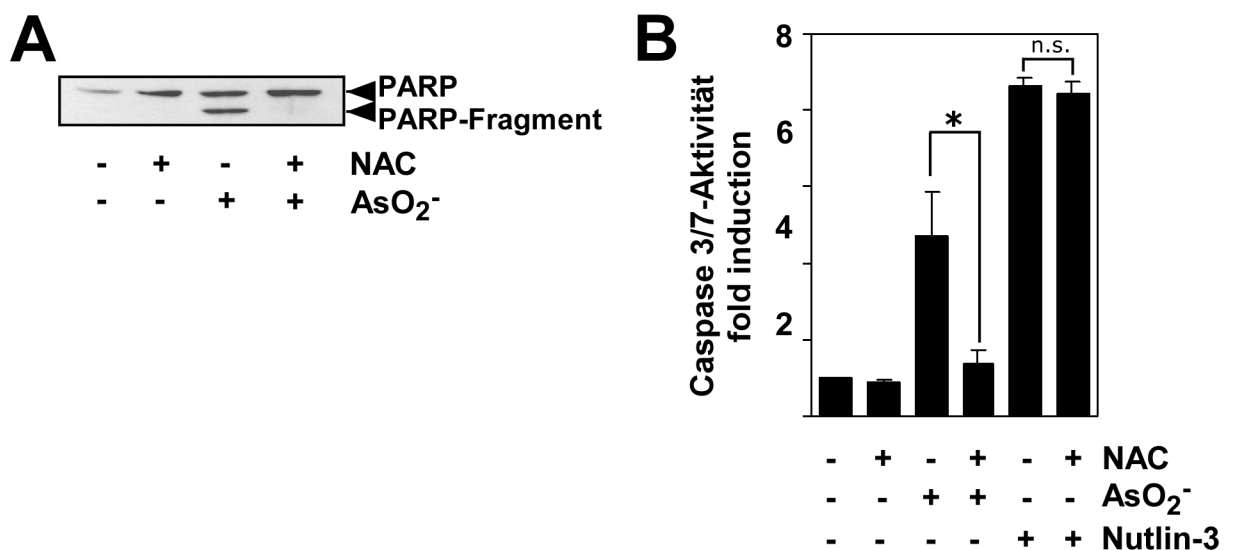
SH-SY5Y-Zellen wurden mit SP600125 behandelt und (A) mit Arsenit bzw. (B) mit C2-Ceramide stimuliert. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ; \*, signifikant,  $P < 0,05$ ).



## 4.10 Arsenit führt in Neuroblastomzellen zu oxidativem Stress

### 4.10.1 N-Acetyl-L-Cystein verhindert in SH-SY5Y-Zellen die Arsenit-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 sowie die erhöhte Expression von p53 und c-Jun

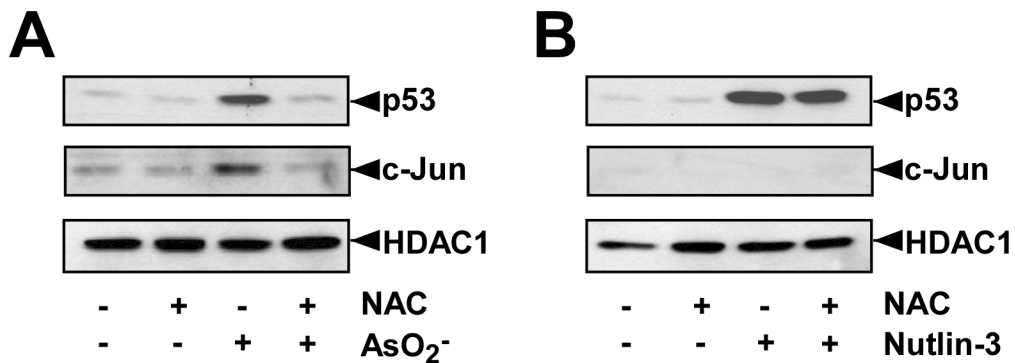
Es gibt Hinweise, dass der Arsenit-induzierte Zelltod durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und dem daraus resultierenden oxidativen Stress ausgelöst wird (Miller et al., 2002; Gupta et al., 2003, Kumagai und Sumi, 2007). Um dies zu untersuchen wurden die Zellen mit dem Radikalfänger N-Acetyl-Cystein (NAC) behandelt und mit Arsenit stimuliert. Als Kontrolle wurden NAC-behandelte Zellen mit Nutlin-3 stimuliert, das nicht zu oxidativem Stress führt. Wie in Abbildung 32 gezeigt ist, konnte eine Vorinkubation mit NAC die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit aber nicht durch Nutlin-3 reduzieren.



**Abbildung 32: Der Radikalfänger N-Acetyl-L-Cystein reduziert die Aktivierung der Caspasen 3 und 7.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit N-Acetyl-L-Cystein behandelt und mit Arsenit (B) bzw. Nutlin-3 stimuliert und geerntet. (A) Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen PARP analysiert. (B) Die Zellen wurden geerntet und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen (n.s., nicht signifikant,  $P > 0,05$ ; \*, signifikant,  $P < 0,05$ ).

Abbildung 33 A zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit NAC eine Arsenit-induzierte Expressionserhöhung von p53 und c-Jun verhinderte. NAC konnte jedoch nicht die Expression von p53 durch Nutlin-3 verringern (Abbildung 33 B).



**Abbildung 33: Der Radikalfänger N-Acetyl-L-Cystein reduziert die Arsenit-induzierte Expression von p53 und c-Jun, nicht aber die Expression von p53 durch Nutlin-3.**

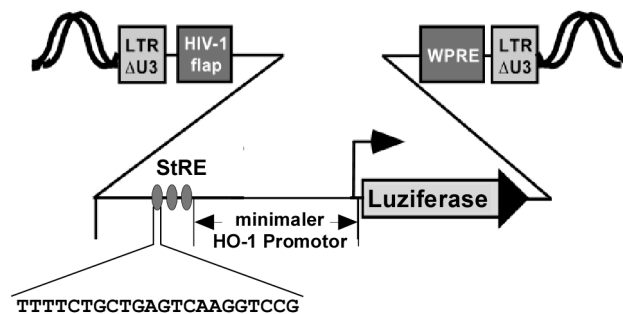
SH-SY5Y-Zellen wurden mit N-Acetyl-L-Cystein behandelt und mit (A) Arsenit oder (B) Nutlin-3 stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und im Western Blot mit Antikörpern gegen p53 und c-Jun, HDAC1 diente als Ladekontrolle, analysiert.

#### **4.10.2 Arsenit erhöht in Neuroblastomzellen transkriptionell die Aktivität des Stress-responsiven Elementes**

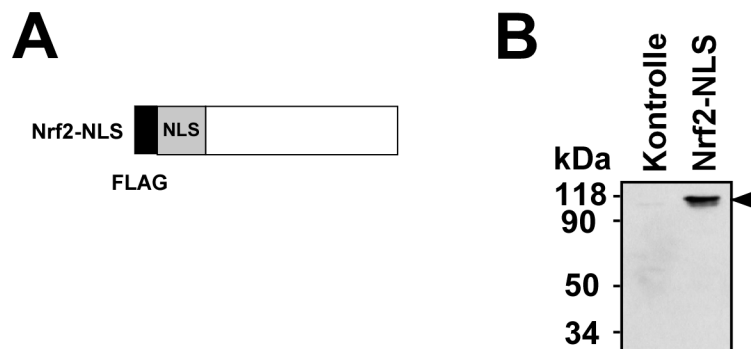
Das Stress-responsive Element (StRE), auch antioxidativ-responsives Element (ARE) genannt, reguliert die Induktion verschiedener Enzyme wie der Hämoxxygenase, der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase, sowie die Induktion der an Entgiftungsreaktionen beteiligten Enzyme, wie der Glutathion-S-Transferase und der NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (Itoh et al., 1997; Wild et al., 1999; Gong et al., 2002). Das StRE kann durch Mitglieder der AP-1-Familie aktiviert werden, da die Sequenz der Konsensussequenz des TPA-responsiven Elements (TRE) ähnelt (Kataoka et al., 1994).

Die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors Nrf2 besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz des ARE und ist wichtig für die Aktivierung antioxidativer Enzyme wie der Glutathion-S-Transferase und der NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (Itoh et al., 1997; Wild et al., 1999). Nrf2 reguliert die Induktion von HO-1 durch verschiedene Induktoren (Alam J, 1999) und die Überexpression von Nrf2 führt in QT6 Fibroblasten zu einer transkriptionellen Aktivierung des HO-1 Gens über das StRE (Ishii et al., 2000).

Um zu untersuchen ob die Stimulation von Neuroblastomzellen mit Arsenit zu einer StRE-induzierten Genexpression führt, wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die für ein Reportergen kodieren, das vor dem Minimalpromotor drei Kopien des StREs enthielt (Abbildung 34) und mit Arsenit stimuliert. Als Positivkontrolle wurde durch lentiviralen Gentransfer in Neuroblastomzellen Nrf2 überexprimiert. Das Protein besitzt eine Kernlokalisierungssequenz (Abbildung 35 A) und zum immunologischen Nachweis ein Flag-Epitop (Abbildung 35 B). Die Zellen wurden 24 h nach Serumreduktion geerntet.



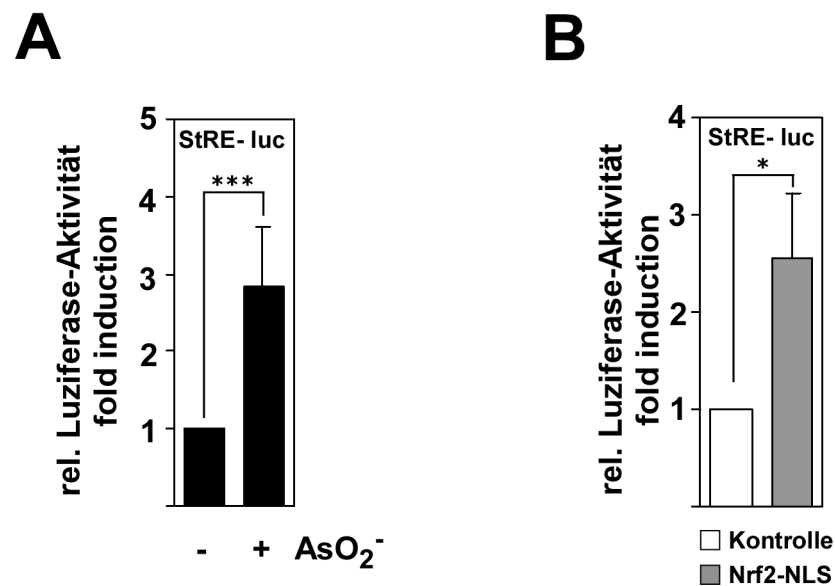
**Abbildung 34: Modulare Struktur des integrierten Provirus, der für ein Stress-responsives Reportergen kodiert.** Vor dem Minimalpromotor des HO-1-Gens befinden sich drei Kopien des Stress-responsiven Elements (StRE).



**Abbildung 35: Überexpression von Nrf2 in SH-SY5Y-Zellen**

(A) Das Protein besitzt eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und ein FLAG-Epitop zum immunologischen Nachweis. (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für Nrf2-NLS kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Serumreduktion geerntet und Kernextrakte präpariert. Im Western Blot wurde die Expression von Nrf2-NLS mit einem gegen das FLAG-Epitop spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Die Überexpression von Nrf2 führte zu einer erhöhten Aktivität des Reportergens (Abbildung 36 B). Die Stimulation mit Arsenit führte zu einer StRE-vermittelten Genexpression (Abbildung 36 A).



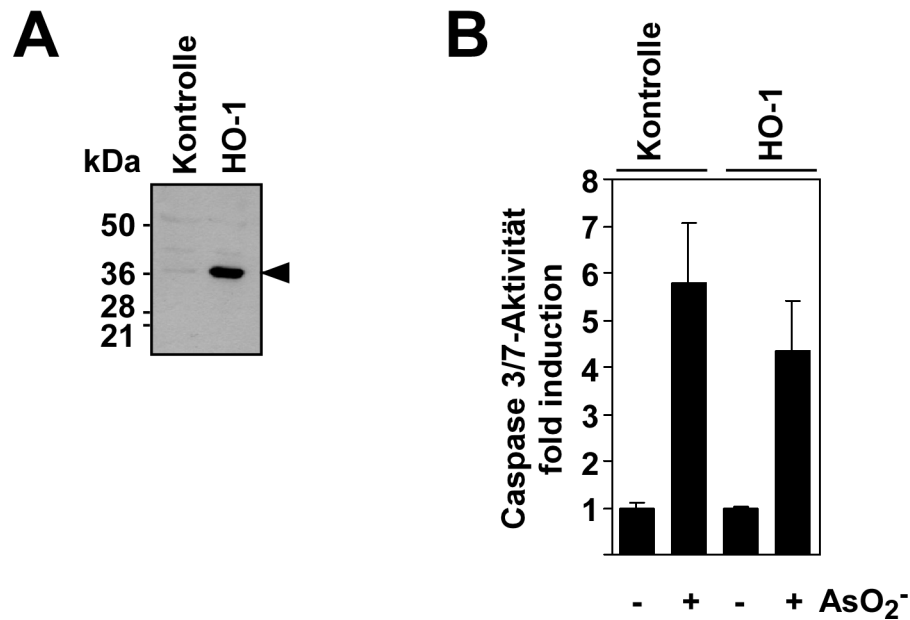
**Abbildung 36: Arsenit induziert in Neuroblastomzellen die StRE-vermittelte Genexpression.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für ein Stress-responsives Reportergen kodierten und (A) mit Arsenit stimuliert. (B) Die Zellen wurden zusätzlich mit Lentiviren infiziert, die für ein kernlokalisiertes Nrf2 kodierten. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert., die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. Die Zellen wurden geerntet und eine Reportergenanalyse durchgeführt. Dabei wurde die gemessene Luziferaseaktivität an der Proteinkonzentration normalisiert (\*, signifikant,  $P < 0,01$ ; \*\*\*, hoch signifikant,  $P < 0,001$ ).

#### **4.10.3 HO-1 schützt nicht vor einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen durch Arsenit**

Die Hämoxygenase 1 (HO-1) ist das Schlüsselenzym, im Hämstoffwechsel. Es wird als Stress-responsives Protein bezeichnet, da seine Expression durch unterschiedliche Stimuli wie Häm, Hyperthermie, Schwermetalle und UV-Bestrahlung verstärkt wird (Keyse und Tyrrell, 1989). Auch Arsenit induziert die Expression von HO-1 in unterschiedlichen Zelltypen (Gong et al., 2002; Keyse et al., 1990). Die im Hämstoffwechsel entstandenen Produkte haben weitere Auswirkungen auf das biologische System der Zellen. Zusammengefasst führen sie zu einem Schutz vor oxidativem Stress. Chen et al. (2000) schützten durch die Überexpression von HO-1 Neurone vor Zelltod durch Glutamat bzw.  $H_2O_2$ . HO-1 wird als Ansatz für verschiedene Therapien genutzt (Abraham und Kappas, 2008; Volti et al., 2008; Naito et al., 2011).

Um zu untersuchen ob eine Überexpression von HO-1 einen Schutz vor der erhöhten Caspase-3/7 Aktivität durch Arsenit darstellt, wurde in den Neuroblastomzellen durch lentiviralen Gentransfer HO-1 überexprimiert. Der Nachweis der Überexpression erfolgte im Western Blot mit einem spezifischen HO-1-Antikörper (Abbildung 37 A). Die HO-1-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen wurden mit Arsenit stimuliert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen. Die Überexpression von HO-1 führte nicht zu einer verminderten Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Neuroblastomzellen (Abbildung 37 B).



**Abbildung 37: Die Überexpression von HO-1 in SH-SY5Y-Zellen beeinträchtigt nicht die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit.**

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren, die für HO-1 kodierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem pFUW-Plasmid generiert worden waren. (A) Ganzzelextrakte wurden präpariert und das Protein mit einem Antikörper gegen HO-1 im Western Blot nachgewiesen. (B) Die Zellen wurden mit Arsenit stimuliert und die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit dem CaspaseGlo-Substrat gemessen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Arsen in der Medizin

Arsenhaltige Verbindungen wie Arsenit wurden schon früh in der Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen eingesetzt. Es musste jedoch eine genaue Abwägung zwischen der Toxizität und dem therapeutischen Nutzen gemacht werden. Denn wie Paracelsus schon feststellte, „allein die Dosis macht das Gift“ (Paracelsus, *dritte defensio* 1538). In der Mitte des Neunzehnten Jahrhunderts wurden arsenhaltige Verbindungen aufgrund der hohen Toxizität von Arsen und den verschiedenen arsenhaltigen Verbindungen kaum noch als Therapiemittel in der westlichen Medizin verwendet. In der Traditionellen Chinesischen Medizin dagegen werden seit Jahrhunderten arsenhaltige Verbindungen eingesetzt. Dieses Wissen um die Wirkung von Arsentrioxid wendeten chinesische Forscher um 1970 an, um Patienten mit resistenter APL zu behandeln (Shen et al., 1997). Die positiven Resultate führten dazu, dass heute auch in der westlichen Medizin der Einsatz von Arsentrioxid Standard bei der Behandlung von APL ist (Soignet et al., 1998 und 2001). Da der Einsatz von Arsentrioxid bei APL so erfolgreich war, wird diese Verbindung auch bei anderen Krebserkrankungen wie z.B. Leukämien und Multiplen Myelomen eingesetzt. Aber auch bei der Behandlung von soliden Tumoren der Brust und der Nieren, Prostatakrebs, metastasierendem Leberkrebs und Glioma wird Arsentrioxid getestet (Akao et al., 1999; Øra et al., 2000; Dilda und Hogg, 2007; Petterson et al., 2007). Neuroblastome machen rund 7-10 % aller pädiatrischen Melanome aus und gehören so mit zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern (Øra und Eggert, 2011). Da dieses Tumorleiden schwere Verlaufsformen annehmen kann und die bisherigen Therapien sehr aggressiv sind, müssen neue Therapieformen gefunden werden. Ein möglicher Ansatz ist die Behandlung von Neuroblastomen mit Arsentrioxid (Petterson et al., 2007).



## **5.2 Der molekulare Mechanismus von Arsenit**

### **5.2.1 Arsenit und Apoptose**

Unter Apoptose versteht man den programmierten, da kontrolliert ablaufenden Zelltod von Zellen, der ermöglicht das umliegende Gewebe zu erhalten. Arsenit führt in verschiedenen Zelltypen zur Apoptose. Jedoch ist der genaue molekulare Mechanismus hinter diesem induzierten Zelltod nicht vollständig aufgeklärt (Shao et al., 1998).

#### **5.2.1.1 Arsenit und Caspasen**

In der Vermittlung des Apoptose-Signals spielen Caspasen eine zentrale Rolle (Slee et al., 1999). Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihr Substrat nach einer Aspartatgruppe spalten (Earnshaw et al., 1999). Es gibt zwei Gruppen von Caspasen. Die Initiatorcaspasen (Caspase 8-10) stehen am Anfang des Apoptosesignals, während die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) in der Exekutionsphase der Apoptose zum Einsatz kommen. Diese Proteine werden als inaktive Procaspasen in den Zellen exprimiert und durch die Initiatorcaspasen proteolytisch zu aktiven Caspasen gespalten. Als aktive Caspasen können sie zelluläre Substrate wie antiapoptotische Proteine und Proteine der DNA-Reparatur spalten und so das Apoptosesignal in der Zelle weiterleiten.

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 dient als Indikator für programmierten Zelltod, da sie zelluläre Substrate spalten und am Ende der Caspasekaskade stehen. Die Caspase 3 wird in SH-SY5Y-Zellen stark exprimiert (Johnson et al., 1999). Arsenit kann in verschiedenen Zelltypen wie humanen Magenkrebszellen und den humanen Neuroblastomzellen zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 führen (Akao et al., 1999; Øra et al., 2000; Jiang et al. 2001, diese Arbeit).

### 5.2.1.2 Arsenit und p53

Der Tumorsuppressor p53 ist ein wichtiges stress-induzierbares Signalprotein, das über Zellzyklusarrest die DNA-Reparatur und bei Bedarf weiter die Apoptose einleiten kann (Lane DP, 1992). Bei Tumoren ist häufig eine Mutation des p53 zu finden (Green und Kroemer, 2009). Dadurch kann p53 bei Zellstress und DNA-Schädigung nicht mehr seiner Funktion als Wächter des Genoms nachkommen (Lane DP, 1992). So erklärt sich, dass Tumore nicht der Regulation gesunder Zellen unterliegen und es zu einer unkontrollierten Vermehrung der Tumorzellen kommt. In Neuroblastomen liegt selten eine mutierte Form des p53 vor. Becker et al. (2007) zeigten, dass in Neuroblastomzellen p53 durch Ansammlung im Zytoplasma inaktiv war. Chen et al. (2007) zeigten dagegen, dass p53 bevorzugt im Nukleus vorliegt. Des Weiteren berichteten Chen et al. (2007) und Xue et al. (2007), dass Neuroblastomzellen, die nach DNA-Schaden eine normale transkriptionelle Antwort zeigten, die Wildtypform von p53 besaßen. Die hier untersuchten SH-SY5Y-Zellen exprimieren die Wildtypform von p53 (Paulsen et al., 2006).

Arsenit wurde in verschiedenen Zellen als ein Induktor von p53 beschrieben. So ist in humanen Magenkrebszellen, T-Lymphozyten und HeLa-Zellen der Arsenit-induzierte Zelltod mit einer verstärkten Expression des p53 in Zusammenhang gebracht worden (Jiang et al., 2001; Salazar et al., 1997).

Karlsson et al. (2004) publizierten, dass bei Neuroblastomzellen p53 keine Rolle bei der Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Arsenit spielte. Dabei ist zu beachten, dass Karlsson et al. (2004) verschiedene Neuroblastomzelllinien miteinander verglichen. Durch den Vergleich von, in ihrem p53-Status verschiedenen, Zellen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der Arsenit-induzierte Zelltod unabhängig von p53 erfolgte (Karlsson et al., 2004). In dieser Arbeit konnte dagegen mit zwei unabhängigen Methoden, der Inhibierung der Oligomerisierung von p53 bzw. der Reduktion der Expression von p53 durch die Expression einer spezifischen shRNA, der Beweis geliefert werden, dass p53 für die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und den programmierten Zelltod durch Arsenit verantwortlich ist. Diese Resultate werden gestützt durch Versuche mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3. Auch hier konnte die Inhibierung der p53-Oligomerisierung bzw. der Reduktion der

Expression von p53 durch die Expression einer spezifischen shRNA von p53 die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und den programmierten Zelltod verhindern.

### **5.2.1.3 p53 im Arsenit-induzierten Zelltod: Translokation vs. Transkription**

Bei der Beteiligung des p53 am programmierten Zelltod werden zwei Wege diskutiert, die Translokation von p53 zu den Mitochondrien und die Aktivierung der Transkription der p53-Zielgene (Amaral JD, 2010).

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der Sequenz-spezifisch die Transkription seiner Zielgene wie z.B. p21, Bax, Puma, Noxa und Killer reguliert (Green und Kroemer, 2009; Vousden und Prives, 2009). Vor allem Puma trägt zum, durch p53-aktivierte Transkription bedingten, Zelltod bei. In Puma-„Knockout“-Mäusen zeigten Thymuszellen nach Bestrahlung einen reduzierten p53-abhängigen Zelltod (Jeffers et al., 2003). Dabei konnte p53 ohne Puma nicht zur Induktion des Zelltods führen. p53 vermittelt demnach als Aktivator der Transkription von Puma den Zelltod. p53 kann auch als Repressor der Transkription zur Apoptose führen, in dem es die Transkription antiapoptotischer Proteine wie z.B. Survivin reduziert und so die Caspasen aktiviert (Hoffman et al., 2002).

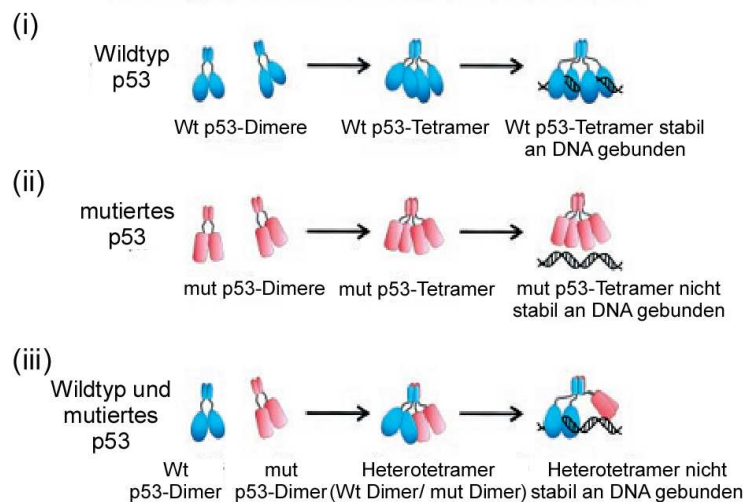
Uo et al. (2007) zeigten, dass in postnatalen Neuronen des Kortex p53 eindeutig auf transkriptioneller Ebene das apoptotische Signal weiterleitete. Sowohl durch die Stimulation der Zellen mit dem Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin als auch mit Nutlin-3 kam es zu einer Akkumulation von p53 im Nukleus und zur Aktivierung der Caspase 3. Außerdem zeigten Versuche mit einem p53-responsiven Reportergen, dass das induzierte p53 in kortikalen Neuronen tatsächlich transkriptionell aktiv war (Uo et al., 2007).

Seit Mitte der Neunziger Jahre wird ein alternativer p53-abhängiger Apoptoseweg diskutiert. Es wurde beschrieben, dass transkriptionell-inaktive Mutanten von p53 Apoptose in HeLa-Zellen induzieren konnten (Haupt et al., 1995). Zu diesem Ergebnis passt auch, dass die Expression einer Temperatur-sensitiven p53-Mutante die Apoptose ohne RNA oder Protein-Synthese vermitteln konnte (Caelles et al., 1994) und in Nukleus-freien Zytoplasten die Apoptose durch p53 induziert werden konnte (Chipuk et al., 2003). Zusammengefasst

sprechen die Beobachtungen dafür, dass zytoplasmatisches p53 ohne Transkription zur Apoptose führen kann. Nach der Bestrahlung von Mäusen kam es zu einer Translokation von p53 und p53 konnte an den Mitochondrien nachgewiesen werden (Erster et al., 2004). Das gleiche passierte bei Hypoxie-sensitiven Neuronen des Hippocampus, wenn es in Rattenhirnen zu Ischämien kam (Endo et al., 2006). Das zytoplasmatische p53 kann durch verschiedene Zelltod-Stimuli zu den Mitochondrien wandern. Diese Translokation des zytoplasmatischen p53 wird als Ursache für die Übertragung des Apoptose-Signals gesehen. Moll et al. (2006) haben ein Modell entwickelt, wie die Translokation von p53 zu den Mitochondrien zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und zum Zelltod führt. So lösen sich durch die Translokation des p53 hin zu den Mitochondrien die antiapoptotischen BH3-Proteine wie BclXL und Bcl2 von den proapoptotischen Proteinen wie Bax und Bak. Diese bilden Homodimere, das mitochondriale Cytochrom c wird freigesetzt und es kommt zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, die letztendlich zum induzierten Zelltod führt (zum Überblick Moll et al., 2006; Vaseva und Moll, 2009).

Meine Resultate sprechen für einen transkriptionellen p-53 abhängigen Apoptoseweg und unterstützen die Ergebnisse von Uo et al. (2007). So induzierte Arsenit die Akkumulation von p53 im Nukleus und aktivierte die Caspasen 3 und 7. Außerdem aktivierte Arsenit wie bei Uo et al. (2007) die Transkription des p53-responsiven Reportergens.

Ein weiterer Aspekt, der für eine transkriptionelle Vermittlung des Apoptosesignals spricht, betrifft die Oligomerisierung von p53. p53 aktiviert die Transkription seiner Zielgene als Tetramer. Bei der Translokation von p53 bewegen sich aber hauptsächlich Monomere zu den Mitochondrien hin. Und diese p53-Monomere können nicht durch p53-Mutanten wie dem hier verwendeten p53DD gebunden werden (Vaseva und Moll, 2009). Abbildung 38 zeigt, wie p53DD als Mutante von p53 mit p53 interagiert und die Transkription von p53-Zielgenen unterbindet.



**Abbildung 38: Bindung von p53-Homo- bzw. Heterotetrameren an die DNA.**

(i) Die Wildtypform (blau dargestellt) von p53 bildet erst Homodimere, dann Homotetramere, die stabil an die DNA binden können. (ii) Mutierte (rot dargestellt) p53-Monomere bilden Homodimere, die jedoch als Tetramere nicht an die DNA binden können. (iii) Wildtyp-Homodimere und mutierte Homodimere bilden Heterotetramere, die nicht stabil an die DNA binden können (modifiziert nach Nicholls et al., 2002).

Demnach zeigt die erfolgreiche Inhibition des p53-vermittelten Zelltods durch p53DD, dass es im Falle der Arsenit-Stimulation zur Ausbildung von p53-Tetrameren und damit zu einer transkriptionellen Aktivierung durch dieses Protein kommt.

Watcharasit et al. (2008) zeigten, dass p53 durch Arsenit in SH-SY5Y-Zellen zu den Mitochondrien translozierte und sahen dies als Ursache für den Arsenit-induzierten Zelltod der Zellen. Es fehlt aber der kausale Zusammenhang zwischen der Translokation und dem induzierten Zelltod. Der kausale Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität von p53 und dem durch Arsenit induzierten Zelltod konnte in dieser Arbeit durch die Blockade des Zelltods durch p53DD bzw. die Reduktion der Expression von p53 dargestellt werden.

Des Weiteren ist es schwierig die Ergebnisse der Studie von Watcharasit et al. (2008) mit denen dieser Arbeit zu vergleichen, da Watcharasit et al. (2008) mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M Arsenit eine viel höhere Konzentration an Arsenit eingesetzt haben als in dieser Arbeit.

#### **5.2.1.4 Arsenit, c-Jun und JNK**

Der genetische Beweis für eine Regulation von c-Jun über JNK konnte *in vivo* durch Studien mit Mäusen geliefert werden, deren c-Jun-Allele durch einen Tausch der Serine 63 und 73 durch Alanine mutiert worden waren (*JunAA*) (Behrens et al., 1999). In diesen Mäusen konnten die Serine 63 und 73 von c-Jun nicht mehr durch JNK phosphoryliert werden und c-Jun damit nicht aktiviert werden. Die Mäuse wiesen ein geringeres Zellwachstum auf, welches sich in der reduzierten Körpergröße zeigte. Außerdem waren sie vor einem JNK-vermitteltem Zelltod wie UV-Bestrahlung und Behandlung mit Kainat geschützt. Weitere Studien zeigen, dass unterschiedliche Stimuli über die Aktivierung von JNK zum induzierten Zelltod führen. In PC12-Zellen aktivierte der Entzug des Wachstumsfaktors NGF (nerval growth factor) JNK und c-Jun und führte zum Zelltod (Xia et al., 1995; Le-Niculescu et al., 1999). In primären granulären Neuronen des Cerebellums führte der Entzug von Kalziumchlorid ebenfalls über die Aktivierung von JNK zum Zelltod (Le-Niculescu et al., 1999). Die Stimulation der Glutamatrezeptoren in Neuronen des Hippocampus durch Kainat führte in Mäusen zur Apoptose. Dieser zytotoxische Effekt trat jedoch nicht in Neuronen von Mäusen auf, denen das JNK3-Isozym fehlte (*JNK3<sup>-/-</sup>*) (Yang et al., 1997). Der Glutamat-induzierte Zelltod in Neuronen des Hippocampus war also abhängig von JNK. Da sich die *JNK3<sup>-/-</sup>*-Mäuse neuroanatomal normal entwickelten, spielt JNK wohlmöglich keine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und führt eher bei Stress zur Apoptose (Le-Niculescu et al., 1999).

Einige Studien zeigen, dass Arsenit als ein Aktivator der JNK (Cavigelli et al., 1996) über den JNK-vermittelten Signalweg und unabhängig von p53 zum induzierten Zelltod führte. In einer epidermalen Zelllinie der Maus führte Arsenit zum Zelltod. Dieser Zelltod konnte durch die Expression einer negativen JNK1-Mutante verhindert werden. Während die Arsenit-Stimulation zu einer Aktivierung der JNK führte, konnte jedoch keine transkriptionelle

Aktivität von p53 gemessen werden (Huang et al., 1999). In Neuronen des Cortex aktivierte Arsenit die Stresskinasen JNK3 und p38. Der Arsenit-induzierte Zelltod konnte durch Inhibitoren für beide Kinasen verhindert werden (Namgung und Xia, 2000). Arsenit aktivierte in APL-Zellen JNK und führte über diese Kinase zum Zelltod (Davison et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen einen JNK-vermittelten Zelltod in Arsenit-stimulierten Neuroblastomzellen. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und der programmierte Zelltod der Neuroblastomzellen konnte nicht durch die dominant negative Mutante von c-Jun bzw. durch die Reduktion der c-Jun-Expression durch die Expression der spezifischen shRNA verhindert werden. Wie in den primären granulären Neuronen des Cerebellums konnte MEKK1 auch in dieser Arbeit c-Jun aktivieren und die Caspasen 3 und 7 aktivieren (Le-Niculescu et al., 1999). Dies zeigt, dass in den Neuroblastomzellen JNK aktiviert werden und die Apoptose einleiten kann, jedoch nicht am Arsenit-induzierten Zelltod beteiligt ist.

Dass c-Jun durch eine Behandlung der Zellen mit Arsenit trotzdem vermehrt exprimiert und aktiviert wurde, kann durch den durch die Stimulation mit Arsenit hervorgerufenen oxidativen Stress erklärt werden. Da JNK und damit zusammenhängend auch der Transkriptionsfaktor c-Jun durch oxidativen Stress aktiviert werden kann (Martindale und Holbrook, 2002), wäre dies also eine mögliche Erklärung für die durch Arsenit zwar erhöhte, aber für den Zelltod nicht notwendige, Expression und Aktivierung von c-Jun. Eine weitere Erklärung liefert Lenczowski et al. (1997), die zeigten, dass in Jurkat-Zellen Fas zu einer Aktivierung von JNK führte, c-Jun aber nicht aktiviert wurde. Da die Inhibition der JNK-Aktivierung durch eine negative Mutante von SEK1 nicht vor dem Fas-induzierten Zelltod schützen konnte, ist der Fas-induzierte Zelltod in Jurkat-Zellen unabhängig von der Aktivierung von JNK (Lenczowski et al., 1997). Die Aktivierung der Kinase kann als eine Folge der aktivierten Caspasekaskade gesehen werden (Le-Niculescu et al., 1999).

### 5.2.2 Arsenit und oxidativer Stress

Arsenit induziert in verschiedenen Zelltypen oxidativen Stress (Chen et al., 1998; Miller et al., 2002; Gupta et al., 2003). Dabei zeigt das dreiwertige Arsen des Arsenits eine hohe Affinität zu den Sulfhydrylgruppen von Proteinen (Carney DA, 2008; Emadi und Gore, 2010). Oxidativer Stress entsteht, wenn das sensible Redox-System in Zellen gestört ist. Ein wichtiges Protein in diesem System ist Glutathion. Miller et al. (2002) zeigten, dass ein niedriger Glutathionspiegel die Sensitivität gegenüber Arsenit erhöht. Dagegen zeigen Zellen mit einem höheren Glutathionspiegel eine höhere Resistenz gegenüber Arsenit (Miller et al., 2002). Dies ist ein Ansatzpunkt für die Behebung von oxidativem Stress. So können einerseits Tumorzellen durch die Gabe von Buthioninsulfoximin, einem spezifischen Inhibitor der Glutathionsynthese, für die Arsenitbehandlung sensibilisiert werden (Dai et al., 1999). Auf der anderen Seite kann das Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) das Gleichgewicht des Redoxzyklus aufrechterhalten. NAC schützt, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, vor dem induzierten Zelltod durch Arsenit (Grad et al., 2001; Lau et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte NAC nicht vor dem Nutlin-3-induzierten Zelltod, der auf einer gestörten Interaktion zwischen p53 und MDM2 und der daraus resultierenden Akkumulation von p53 beruht, schützen. Dies zeigt, dass Arsenit oxidativen Stress in der Zelle auslöst. Dabei spricht die Tatsache, dass NAC die durch Arsenit-induzierte vermehrte Expression der Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun verhindern konnte, dafür, dass die vermehrte Expression dieser Transkriptionsfaktoren durch den oxidativen Stress ausgelöst wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Nutlin-3-bedingte Expression von p53 nicht durch die Gabe des Antioxidans verringert wurde.

Das Stress-Responsive Element (StRE), auch antioxidativ-responsives Element (ARE) genannt, reguliert die Induktion verschiedener Enzyme wie der Hämoxxygenase-1, der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase, sowie die Induktion der an Entgiftungsreaktionen beteiligten Enzyme, wie der Glutathion-S-Transferase und der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (Itoh et al., 1997; Wild et al., 1999; Gong et al., 2002). Das StRE kann durch Mitglieder der AP-1 Familie aktiviert werden, da die Sequenz der Konsensussequenz des TPA-responsiven Elements (TRE) ähnelt (Kataoka et al., 1994). Arsenit kann zu einer gesteigerten StRE-abhängigen Genexpression in Hepatomazellen der Maus und humanen Keratinozyten führen



(Gong et al, 2002; Keim A, 2007). In den hier stimulierten Neuroblastomzellen induzierte Arsenit die StRE-abhängige Genexpression. Eine Erklärung für die Aktivierung dieses antioxidativ-responsiven Elements durch Arsenit könnte ein grundlegender zellulärer Mechanismus sein, der dazu führt, dass Zellen bei geringerem Stress durch die Induktion von antioxidativen Proteinen geschützt wären.

Die Hämoxygenase-1 wird durch verschiedene Induktoren des oxidativen Stress über das StRE aktiviert und ist das Schlüsselenzym im Hämstoffwechsel (Chen et al., 2000). Da die beim Hämabbau entstandenen Produkte weitere Auswirkungen auf das biologische System der Zellen haben, wird in verschiedenen Therapieansätzen versucht die Auswirkungen von oxidativen Stress durch HO-1 zu beheben (Abraham und Kappas, 2008; Volti et al., 2008; Naito et al., 2011). Neurone konnten z.B. durch die Überexpression von HO-1 vor Zelltod durch Glutamat bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  geschützt werden (Chen et al., 2000). In dieser Arbeit konnte die Überexpression von HO-1 die Neuroblastomzellen nicht vor dem Zelltod durch Arsenit schützen.

### 5.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Arsenit-induzierte Zelltod in Neuroblastomzellen am Beispiel der humanen Zelllinie SH-SY5Y untersucht. Dabei konnte der molekulare Mechanismus des Arsenit-induzierten Zelltods in den Neuroblastomzellen weiter aufgeklärt werden. So ist p53 transkriptionell für die Induktion des durch Arsenit hervorgerufenen Zelltods verantwortlich.

Seit 2007 läuft am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, NY) eine Phase II Studie über die Arsenit-Monotherapie und eine Kombinationstherapie von Arsenit und Bestrahlung mit dem Einsatz von  $^{131}\text{I}$ -meta-Iodobenzylguanidin von Neuroblastomen (Dilda und Hogg, 2007). Da Nutlin-3 eine vielversprechende Substanz in der Behandlung von Neuroblastomen darstellt und auch wie Arsenit über p53 zum induzierten Zelltod führt, wäre es eine Überlegung, eine Kombination aus beiden Verbindungen in der Behandlung von Arznei-resistenten Neuroblastomen einzusetzen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1) Abraham NG, Kappas A (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews* 60:79-127
- 2) Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K (1999) Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through activation of caspase 3 in vitro. *FEBS Letters* 455:59-62
- 3) Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AMK, Cook JL (1999) Nrf, a cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *The Journal of Biological Chemistry* 274:26071-26078
- 4) Amaral JD (2010) The role of p53 in apoptosis. *Discovery Medicine* 9:145-152
- 5) Baxevanis AD, Vinson CR (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Current Opinion in Genetics and Development* 3:278-285
- 6) Becker K, Marchenko ND, Maurice M, Moll UM (2007) Hyperubiquitylation of wild-type p53 contributes to cytoplasmic sequestration in neuroblastoma. *Cell Death and Differentiation* 14:1350-1360
- 7) Behrens A, Sibilio M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature Genetics* 21:326-329
- 8) Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (2001) SP600125, an anthraoyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13681-13686
- 9) Berthold F, Hero B (2000) Neuroblastoma: Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59:1261-1277

- 10) Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research* 33:2643-2552
- 11) Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *National Review Cancer* 3:203-216
- 12) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553
- 13) Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee J-K (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 90:8033-8307
- 14) Caelles C, Heimberg A, Karin M (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370:220-223
- 15) Carney DA (2008) Arsenic trioxide mechanisms of action – looking beyond acute promyelocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 49:1846-1851
- 16) Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *The EMBO Journal* 15:6269-6279
- 17) Chen K, Gunter K, Maines MD (2000) Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *Journal of Neurochemistry* 75:304-313
- 18) Chen L, Malcolm AJ, Wood KM, Cole M, Variend S, Cullinane C, Pearson ADJ, Lunec J, Tweedle DA (2007) p53 is nuclear and functional in both undifferentiated and differentiated neuroblastoma. *Cell Cycle* 6:2685-2696
- 19) Chen L, Iraci N, Gherardi S, Gamble LD, Wood KM, Perini G (2010) p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Research* 70:1377-1388

- 20) Chen Y-C, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K (1998) Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 177:324-333
  
- 21) Chipuk JE, Maurer U, Green, DR, Schuler M (2003) Pharmacological activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4:371-381
  
- 22) Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y (1999) Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 93:268-277
  
- 23) Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr (2004) JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 103:3496-3502
  
- 24) Deng J, Dayam R, Neamati N (2006) Patented small molecule inhibitors of p53-MDM2 interaction. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 16:165-188
  
- 25) Dilda PJ, Hogg PJ (2007) Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treatment Reviews* 33:542-564
  
- 26) Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68:383-424
  
- 27) Emadi A, Gore SD (2010) Arsenic trioxide - an old drug rediscovered. *Blood Reviews* 24:191-199
  
- 28) Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chen PH (2006) Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *The Journal of Neuroscience* 26:7974-7983

- 29) Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM (2004) In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Molecular and Cellular Biology* 24:6728-6741
  
- 30) Freund A, Jolivel V, Durand S, Kersual N, Chalbos D, Chavey C, Vignon F, Lazennec G (2004) Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene* 23:6105-6114
  
- 31) Fulda S, Debatin K-M (2000) Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Medical and Pediatric Oncology* 35:616-618
  
- 32) Galcheva-Gargova Z, Dérjard B, Wu IH, Davis RJ (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265:806-808
  
- 33) Gong P, Stewart D, Hu B, Vinson C, Alam J (2002) Multiple basic-leucine zipper proteins regulate induction of the mouse heme oxygenase-1 gene by arsenite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405:265-274
  
- 34) Gottlieb E, Haffner R, Rüden von T, Wagner EF, Oren M (1994) Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *The EMBO Journal* 13:1368-1374
  
- 35) Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH (2001) Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 98:805-813
  
- 36) Green RG, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127-1130
  
- 37) Gupta S, Yel L, Kim D, Kim C, Chiplunkar S, Gollapudi S (2003) Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics* 2:711-719

- 38) Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14:927-939
- 39) Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame SJ, Shah B (2000) c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 60:1015-1021
- 40) Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes and Development* 9:2170-2183
- 41) Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic *survivin* gene by wild type p53. *The Journal of Biological Chemistry* 277:3247-3257
- 42) Huang C, Ma W-Y, Li J, Dong Z (1999) Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Research* 59:3053-3058
- 43) Huang G, Shi LZ, Chi H (2009) Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48:161-169
- 44) Hurst HC (1995) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 2:101-168
- 45) Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 275:16023-16029
- 46) Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:313-322
- 47) Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang JL, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP (2003) Puma is an

- essential mediator of p53-dependent and –independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4:321-328
- 48) Jiang X-H, Wong BC-Y, Yuen S-T, Jiang S-H, Cho C-H, Lai K-C, Lin MCM, Kung H-F, Lam S-K (2001) Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3. *International Journal of Cancer* 91:173-179
- 49) Johnson MD, Kinoshita Y, Xiang H, Ghatan S, Morrison RS (1999) Contribution of p53-dependent caspase activation to neuronal cell death declines with neuronal maturation. *The Journal of Neuroscience* 19:2996-3006
- 50) Karlsson J, Øra I, Pörn-Ares I, Pålman S (2004) Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53. *Clinical Cancer Research* 10:3179-3188
- 51) Kataoka K, Noda M, Nishizawa M (1994) Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Molecular and Cellular Biology* 14:700-712
- 52) Keim A (2007) Stress-induzierte Expression der Hämoxygenase-1: Regulation der Genexpression und die Rolle von basischen Leucin-Zipper-Proteinen. TU Kaiserslautern
- 53) Keyse SM, Tyrrell RM (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:99-103
- 54) Keyse SM, Applegate LA, Tromvoukis Y, Tyrrell RM (1990) Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 10:4967-4969

- 55) Kumagai Y, Sumi D (2007) Arsenic: Signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47:243-262
- 56) Lane DP (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- 57) Landschultz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764
- 58) Lau L, Tai D, Weitzman S, Grant R, Baruchel S, Malkin D (2004) Factors influencing survival in children with recurrent neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 26:227-232
- 59) Lavadière C, Cheung N-K V, Kushner BH, Kramer K, Modak S, LaQuaglia MP, Wolden S, Ness KK, Gurney JG, Sklar CA (2005) Long-term complications in survivors of advanced stage neuroblastoma. *Pediatric Blood and Cancer* 45:324-332
- 60) Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD (1997) Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 17:170-181
- 61) Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas Ligand induction and cell death. *Molecular and Cellular Biology* 19:751-763
- 62) Liu J, Minemoto Y, Lin A (2004) c-Jun N-terminal Protein Kinase 1 (JNK1), but not JNK2, is essential for Tumor Necrosis Factor Alpha-induced c-Jun kinase activation and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 24:10844-10856
- 63) Liu J, Lin A (2005) Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Research* 15:36-42



- 64) Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 292:268-271
- 65) Maris JM, Matthay KK (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 17:2264-2279
- 66) Maris JM (2010) Recent advances in neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine* 362:2202-2211
- 67) Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* 192:1-15
- 68) Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI (2006) Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127:1323-1334
- 69) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *The New England Journal of Medicine* 341:1165-1173
- 70) Mayer SI, Dexheimer V, Nishida E, Kitajima S, Thiel G (2008) Expression of the transcriptional Repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after Gonadotropin-releasing Hormone Receptor stimulation. *Endocrinology* 149:6311-6325
- 71) Miller WHJr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research* 62:3893-3903
- 72) Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Dérijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266:1719-1723

- 73) Moll UM, Marchenko N, Zhang XK (2006) p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25:4725-4743
- 74) Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA (2003) p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochemical Research* 28:15-27
- 75) Müller I, Mayer SI, Keim A, Thiel G (2009) Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *Biospektrum* 01:52-53
- 76) Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Yoshikawa T (2011) Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 48:126-133
- 77) Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267
- 78) Namgung U, Xia Z (2000) Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience* 20:6642-6451
- 79) Nicholls CD, McLure KG; Shielda MA, Lee PWK (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. *The Journal of Biological Chemistry* 277:12937-12947
- 80) Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA (2003) Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research* 63:6643-6650
- 81) Øra I, Bondesson L, Jönsson C, Ljungberg J, Pörn-Ares I, Garwicz S, Pålman S (2000) Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth *in vivo* and promotes apoptotic cell death *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Communications* 277:179-185

- 82) Øra I, Eggert A (2011) Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: Impact on clinical and basic research. *Seminars in Cancer Biology* 21:217-228
- 83) Paulsen MT, Starks AM, Derheimer FA, Hanasoge S, Li L, Dixon JE, Ljungman M (2006) The p53-targeting human phosphatase hCdc14A interacts with the Cdk I/cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Molecular Cancers* 5:25
- 84) Paracelsus (1538) dritte defensio "Dosis sola facit venenum"
- 85) Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D (2008) High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncology* 9:247-256
- 86) Pettersson HM, Karlsson J, Pietras A, Øra I, Pålman S (2007) Arsenic trioxide and neuroblastoma cytotoxicity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39:35-41
- 87) Pritchard J, Hickman JA (1994) Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *The Lancet* 344:869-870
- 88) Ravandi F (2004) Arsenic trioxide: expanding roles for an ancient drug? *Leukemia* 18:1457-1459
- 89) Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics* 33:401-406
- 90) Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E (1997) Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutation Research* 381:259-265
- 91) Shao W, Fanelli M, Ferrara FF, Riccioni R, Rosenauer A, Davison K, Lamph WW, Waxman S, Pelicci PG, Coco FL, Avvisati G, Testa U, Peschle C, Gambacorti-Passerini C, Nervi C, Miller WH Jr (1998) Arsenic trioxide an inducer of apoptosis and loss of

PML/RAR $\alpha$  protein in acute promyelocytic leukemia cells. *Journal of the National Cancer Institute* 90:124-133

- 92) Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu UY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY (1997) Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): II. Clinical Efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89: 3354-3360
  
- 93) Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart-Kupperschmitt A, Charneau P (2000) The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96:4103-4110
  
- 94) Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* 144:281-292
  
- 95) Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP (1998) Complete remission after treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with arsenic trioxide. *The New England Journal of Medicine* 339:1341-1348
  
- 96) Soignet SL, Frankel SR, Douer S, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutre S, Dahlberg S, Ellison R, Warell RP Jr (2001) United States multicancer study of arsenic trioxide in relapsed Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 19:3852-3860
  
- 97) Speidel D (2010) Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology* 20:14-24
  
- 98) Speleman F, De Preter K, Vandesompele J (2011) Neuroblastoma genetics and phenotype: A tale of heterogeneity. *Seminars in Cancer Biology* 21:238-244

- 99) Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova-Foucher E (2006) Neuroblastoma incidence and survival in european children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* 42:2081-2091
- 100) Spohn D, Rössler OG, Philipp SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, Hoth M, Thiel G (2010) Thapsigargin induces expression of Activating Transcription Factor 3 in human keratinocytes involving  $\text{Ca}^{2+}$  ions and c-Jun N-Terminal Protein Kinase. *Molecular Pharmacology* 78: 865-876
- 101) Steinmüller L, Thiel G (2003) Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biological Chemistry* 384:667-672
- 102) Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen W-H, LeClerc JM, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW (2006) C-Jun N-Terminal Kinase mediates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  suppression of differentiation in myoblasts. *Endocrinology* 147:4363-4373
- 103) Tinwell H, Stephens SC, Ashby J (1991) Arsenite as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: Mouse Micronucleus Assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's Solution. *Environmental Health Perspectives* 95:205-210
- 104) Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874
- 105) Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS (2007) Apoptotic actions of p53 require transcriptional activation of PUMA and do not involve a direct mitochondrial/cytoplasmic site of action in postnatal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 27:12198-12210
- 106) Vaseva AV, Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787:414-420

- 107) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303:844-848
- 108) Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME; Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 445:661-665
- 109) Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper models. *Science* 246:911-916
- 110) Vogelstein B, Lane D, Devine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 16:408:307-310
- 111) Volti GL, Sacerdoti D, Di Giacomo C, Barcellona ML, Scacco A, Murabito P, Biondi A, Basile F, Gazzolo D, Abella R, Frigiola A, Galvano F (2008) Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. *World Journal of Gastroenterology* 14:6122-6132
- 112) Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 137:413-431
- 113) Wagner LM, Danks MK (2009) New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 107:46-57
- 114) Watcharasit P, Thianianawat A, Satayavivad J (2008) GSK3 promotes arsenite-induced apoptosis via facilitation of mitochondria disruption. *Journal of Applied Toxicology* 28:466-474
- 115) Westermann F, Schwab M (2002) Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Letters* 184:127-147
- 116) Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT (1999) Regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry* 274:33627-33636

- 117) Wong HK, Fricker M, Wyttenbach A, Villunger A, Michalak EM, Strasser A, Tolkovsky AM (2005) Mutually exclusive subsets of BH3-only proteins are activated by the p53 and c-Jun N-terminal kinase/c-Jun signaling pathways during cortical neuron apoptosis induced by arsenite. *Molecular and Cellular Biology* 25:8732-8747
  
- 118) Wu J, Shao Y, Liu J, Chen G, Ho PC (2011) The medical use of realgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) and its recent development as an anticancer agent. *Journal of Ethnopharmacology* 135:595-602
  
- 119) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331
  
- 120) Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445:656-660
  
- 121) Yang DD, Kuan C-Y, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870
  
- 122) Yih L-H, Lee T-C (2000) Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. *Cancer Research* 60:6346-6352
  
- 123) Zhu X-H, Shen Y-L, Jing Y-K, Cai X, Jia P-M, Huang Y, Tang W, Shi G-Y, Sun Y-P, Dai J, Wang Z-Y, Chen S-J, Zhang T-D, Waxman S, Chen Z, Chen G-Q (1999) Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *Journal of National Cancer Institute* 91:772-778
  
- 124) Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TD (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of Virology* 71:2886-2892

## 7 Publikationen und Poster

### 7.1 Publikationen

Ekici M, Keim A, Rössler OG, Thiel G (2011)

“Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: major regulatory role of REST and Sp1.”

Journal of Cellular Biochemistry Sep 21. doi: 10.1002/jcb.23376

Keim A, Rössler OG, Rothhaar TL, Thiel G

“Arsenite-induced caspase-3/7 activation and chromatin fragmentation in human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun.”

in Arbeit

Keim A, Müller I, Thiel G

“Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer“

in Arbeit



## 7.2 Poster

Keim A, Rothhaar T, Rössler OG, Thiel G

"Arsenite induces oxidative stress and caspase 3-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells involving p53"

Molecular pathways in health and disease of the nervous system, GBM, Study group  
Neurochemistry, Homburg/Saar, Germany, September 11-13. 208

Keim A, Rothhaar T, Rössler OG, Thiel G

"Arsenite induces oxidative stress and caspase 3-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells involving p53"

12<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, Germany, October 29-31, 2008

Keim A, Rothhaar T, Rössler OG, Thiel G

"Different roles of p53 and c-Jun in programmed cell death of human neuroblastoma cells"

34<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Bonn, Germany, March 30, 2011  
- April 2, 2011

## 8 Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Thiel für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Labor anzufertigen und für seine Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke der ganzen Arbeitsgruppe: Karl für alle Plasmide und Antworten auf technische Fragen; Iris für alles Organisatorische; Anke, Andrea und Isabelle für die lustigen Stunden im Labor. Besonders danke ich Anke und Andrea für das Durchlesen des Manuskriptes.

Ich danke der AG Montenarh, vor allem Sabine, die mir mit so manchem Rat weitergeholfen hat.

Priv.-Doz. Dr. Magali Cucchiaroni danke ich für die Möglichkeit, das Fluoreszenzmikroskop zu nutzen.

Ich danke Myriam Ekici, die mir weit über ihre Zeit als Doktorandin in unserer Arbeitsgruppe hinaus immer mit ihrer Freundschaft und ihrem Rat zur Seite gestanden hat.

Ganz besonders danke ich meiner ganzen Familie. Danke, dass ihr immer für mich da wart und mich immer vorbehaltlos unterstützt habt. Julian, ich danke dir dafür, dass du all die Jahre für mich da warst und so viel Geduld mit mir hattest.

## 9 Lebenslauf

Anja Keim

Alex-Müller-Str. 26

67657 Kaiserslautern

geb. 03.Mai 1983 in Kaiserslautern

Beruflicher Werdegang:

- 1993-2002     Burggymnasium Kaiserslautern  
                  erfolgreicher Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife
- 03/02-08/02    Freiwilliges Ökologisches Jahr (FÖJ)  
                  bei Laus GmbH, Neustadt (Wstr.)
- 10/02-03/07    Diplomstudium im Fachbereich Biologie an der TU Kaiserslautern  
                  mit den Hauptfächern Genetik und Zoologie
- 07/06-03/07    Diplomarbeit bei Prof. Dr. rer. nat. Gerald Thiel  
                  „Stress-induzierte Expression der Hämoxygenase-1: Regulation der Gen-  
                  expression und die Rolle von basischen Leucin-Zipper-Proteinen“
- 10/07-09/09    Stipendiatin nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG)  
                  bei Prof. Dr. Gerald Thiel
- 10/09-01/12    wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. Gerald Thiel am Institut für  
                  Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät  
                  Homburg, Saar. Promotion über Apoptose im Nervensystem

